(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202290411 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.05.11

(22) Дата подачи заявки
2020.07.23

(51) Int. Cl. ***C07K 16/40*** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(54) БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕНЫ РОДСТВЕННОЙ КАЛЛИКРЕИНУ ПЕПТИДАЗЫ 2, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/878,964; 62/910,650; 63/030,445**
(32) **2019.07.26; 2019.10.04; 2020.05.27**
(33) **US**
(86) **PCT/IB2020/056972**
(87) **WO 2021/019389 2021.02.04**

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ганезан Раджкумар, Ли Джон, Ло Цзиньцюань, Макдевитт Тереза, Шэнь Фэй, Сун Дэган, Бриттингэм Рэймонд, Венкатарамани Сатядеви, Сингх Санджайа, Чжао Юнхун, И Фан, Ла Порте Шерри Линн (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В вариантах осуществления настоящего изобретения предложены выделенные белки, содержащие антигенсвязывающие домены, которые связывают связанную с каликреином пептидазу 2 (hK2), включая моноспецифические и биспецифические антитела. В дополнительных вариантах осуществления изобретения предложены полинуклеотиды, кодирующие hk2-специфические белки, векторы, клетки-хозяева и способы их получения и применения.

202290411 A1

202290411 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572363EA/032

БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕНЫ РОДСТВЕННОЙ КАЛЛИКРЕИНУ ПЕПТИДАЗЫ 2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 23 июня 2020 г., называется JBI6125USNP1_SL.txt и имеет размер 764 265 байт.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые связывают белок родственной каликреину пептидазы 2 (hK2), включающие антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2, кодирующие их полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева, способы их получения и применения.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Рак предстательной железы занимает второе место среди наиболее часто диагностируемых видов рака и шестое среди основных причин смерти от рака у мужчин; на него приходится 14% (903 500) от общего числа новых случаев рака и 6% (258 400) от общего числа случаев смерти от рака у мужчин во всем мире. Течение рака предстательной железы от постановки диагноза до смерти лучше всего классифицировать как ряд клинических стадий на основании степени заболевания, гормонального статуса и наличия или отсутствия обнаружимых метастазов: локализованное заболевание, повышение уровней простатспецифического антигена (ПСА) после лучевой терапии или хирургического вмешательства без обнаружимых метастазов и клинические метастазы в состоянии до или после кастрации. Несмотря на то что проведение операции, лучевой терапии или комбинация обоих способов лечения может оказывать лечебный эффект на пациентов с локализованным заболеванием, у значительной части этих пациентов происходит рецидив заболевания, о чем свидетельствует повышающийся уровень ПСА, что может привести к развитию метастазов, особенно в группе высокого риска - переход к смертельной стадии заболевания.

Андроген-депривационная терапия представляет собой стандартное лечение, по существу с прогнозируемым исходом: снижение уровня ПСА, период стабильности, в течение которого опухоль не пролиферирует, с последующим возрастанием уровня ПСА и рецидивом в форме кастрационно-резистентного заболевания. Исторически антиандрогенную терапию (терапию ADT) стали использовать в качестве стандарта для лечения пациентов с метастатическим раком предстательной железы.

Родственная калликреину пептидаза 2 (hK2, HK2) представляет собой трипсиноподобный фермент с экспрессией, регулируемой андрогеновым рецептором (AR), специфичный для ткани простаты и рака предстательной железы. hK2 активируется

трансмембранной протеазой серина 2 (TMPRSS2) и секретируется в протоки предстательной железы, где инициирует каскад, который расщепляет семеногелин (внеклеточную матрицу в эякуляте) для повышения подвижности сперматозоидов. Экспрессия hK2 ограничена тканями предстательной железы и ее рака, однако недавно hK2 обнаружена в клеточной линии рака молочной железы и первичных образцах от пациента после соответствующей активации AR-пути стероидными гормонами (U.S. Pat. Publ. №2018/0326102). Подобно ПСА, ретроградное высвобождение каталитически неактивной hK2 в кровь происходит, когда сложная структурная организация предстательной железы нарушается из-за гипертрофии или злокачественной трансформации.

Существует потребность в hK2-связывающих доменах следующего поколения для терапевтических и диагностических целей.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит:

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 137 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 138; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 137 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 138; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 162 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 164 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 165; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 166 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 167; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 168 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 169; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 204 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 205.

В изобретении также предложен выделенный антигенсвязывающий домен, который связывается с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 75 и вариабельную область легкой

цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 74.

В изобретении также предложены выделенные антигенсвязывающие домены, которые связываются с hK2 и содержат определенные аминокислотные последовательности VH и VL.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 137 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 138; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 137 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 138; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 162 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 164 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 165; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 166 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 167; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 168 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 169; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 204 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 205. В конкретном варианте осуществления данного изобретения предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 162 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 75 и вариабельную область легкой цепи (VL) с

последовательностью SEQ ID NO: 74.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2 и содержит определенные аминокислотные последовательности VH и VL.

В изобретении также предложен выделенный химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2).

В изобретении также предложен выделенный химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 137 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 138; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 137 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 138; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 162 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 164 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 165; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 166 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 167; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 168 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 169; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 204 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 205. В конкретном варианте осуществления данного изобретения предложен выделенный химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 162 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163.

В изобретении также предложен выделенный химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с родственной

калликреину пептидазой 2 (hK2), причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 75 и вариабельную область легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 74.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном (таким как CD3).

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, причем выделенный мультиспецифический белок представляет собой выделенный белок антитела к hK2/CD3.

В настоящем изобретении также предложен иммуноконъюгат, содержащий выделенный антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2 в соответствии с настоящим описанием.

В настоящем изобретении также предложен иммуноконъюгат, содержащий выделенный белок, включающий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2 в соответствии с настоящим описанием.

В настоящем изобретении также предложен иммуноконъюгат, содержащий выделенный мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2 в соответствии с настоящим описанием.

В настоящем изобретении также предложен иммуноконъюгат, содержащий выделенный CAR, включающий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2 в соответствии с настоящим описанием.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенный антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2 в соответствии с настоящим описанием.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенный белок, включающий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2 в соответствии с настоящим описанием.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенный мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2 в соответствии с настоящим описанием.

В изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенный мультиспецифический белок в соответствии с настоящим описанием.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенный CAR, включающий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2 в соответствии с настоящим описанием.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид,

кодирующий выделенный антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2 в соответствии с настоящим описанием.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий выделенный белок, включающий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2 в соответствии с настоящим описанием.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий выделенный мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2 в соответствии с настоящим описанием.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий выделенный CAR, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2 в соответствии с настоящим описанием.

В настоящем изобретении также предложен вектор, содержащий полинуклеотид в соответствии с настоящим описанием.

В настоящем описании также предложена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или вектор в соответствии с настоящим описанием.

В изобретении также предложен способ лечения рака, экспрессирующего hK2, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего домена, который связывается с hK2, белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, CAR-T, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, иммуноконъюгата в соответствии с настоящим описанием или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим описанием нуждающемуся в этом субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака, экспрессирующего hK2.

В изобретении также предложен способ снижения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2, у субъекта, включающий введение субъекту антигенсвязывающего домена, который связывается с hK2, белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, CAR-T, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, иммуноконъюгата в соответствии с настоящим описанием или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим описанием в течение времени, достаточного для уменьшения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2.

В изобретении также предложен способ предотвращения развития рака, экспрессирующего hK2, у субъекта, включающий введение антигенсвязывающего домена, который связывается с hK2, белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, CAR-T, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, иммуноконъюгата в соответствии с настоящим описанием

или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим описанием нуждающемуся в этом субъекту для предотвращения развития рака, экспрессирующего hK2, у субъекта.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения доброкачественного поражения у субъекта, подверженного риску развития рака, экспрессирующего hK2, включающий введение антигенсвязывающего домена, который связывается с hK2, белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, CAR-T, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, иммуноконъюгата в соответствии с настоящим описанием или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим описанием нуждающемуся в этом субъекту для лечения доброкачественного поражения.

В изобретении также предложен способ лечения рака предстательной железы у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего домена, который связывается с hK2, белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, CAR-T, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, иммуноконъюгата в соответствии с настоящим описанием или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим описанием нуждающемуся в этом субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака предстательной железы.

В изобретении также предложен способ лечения рака молочной железы у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего домена, который связывается с hK2, белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, CAR-T, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, иммуноконъюгата в соответствии с настоящим описанием или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим описанием нуждающемуся в этом субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака молочной железы.

В изобретении также предложен способ обнаружения рака предстательной железы или рака молочной железы у субъекта, включающий введение субъекту иммуноконъюгата в соответствии с настоящим описанием и обнаружение связывания иммуноконъюгата с hK2, что позволяет обнаруживать рак предстательной железы или рак молочной железы.

В изобретении также предложен набор, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, CAR-T, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, иммуноконъюгат в соответствии с настоящим описанием или фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим описанием.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, связывающееся с антигенсвязывающим доменом, который связывается с hK2 в соответствии с настоящим описанием.

В изобретении также предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий: внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2; трансмембранный домен; и внутриклеточный сигнальный домен, необязательно содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Вышеизложенное станет очевидным из представленного ниже более подробного описания примера вариантов осуществления изобретения, которые проиллюстрированы на прилагаемых графических материалах. TM: трансмембранный.

На **ФИГ. 1** показано выравнивание последовательностей доменов VH mu11B6 (SEQ ID NO: 125), hu11B6 (SEQ ID NO: 5), KL2B357 (SEQ ID NO: 159), KL2B358 (SEQ ID NO: 161), KL2B359 (SEQ ID NO: 139), KL2B360 (SEQ ID NO: 159), HCF3 (SEQ ID NO: 6) и HCG5 (SEQ ID NO: 4).

На **ФИГ. 2** показано выравнивание последовательностей доменов VL mu11B6 (SEQ ID NO: 124), hu11B6 (SEQ ID NO: 2), KL2B357 (SEQ ID NO: 160), KL2B358 (SEQ ID NO: 140), KL2B359 (SEQ ID NO: 140), KL2B360 (SEQ ID NO: 140), LDC6 (SEQ ID NO: 1) и LCB7 (SEQ ID NO: 3).

На **ФИГ. 3** показаны связывающие эпитопы выбранных антител к hK2, сопоставленных с последовательностью антигена hK2. На фигуре показана каждая последовательность как SEQ ID NO: 467.

На **ФИГ. 4А и 4В** показано связывание супернатантов гибридомы с первичными Т-клетками человека. Клон UCHT1 использовали в качестве положительного контроля (Фиг. 1B); изотип мышиного IgG1 (mIgG1) использовали в качестве отрицательного контроля.

На **ФИГ. 5** показано связывание вариантов scFv антител к CD3, экспрессируемых в E. coli, с CD3.

На **ФИГ. 6** показано выравнивание областей VL CD3B815 (SEQ ID NO: 249), CD3W244 (SEQ ID NO: 250), CD3W245 (SEQ ID NO: 251), CD3W246 (SEQ ID NO: 252), CD3W247 (SEQ ID NO: 253), и CD3W248 (SEQ ID NO: 254).

На **ФИГ. 7** показана масс-спектрометрия с водородно-дейтериевым обменом (HDX-MS) CD3W245, связанного с CD3ε человека (CD3ε:CD3W245), и OKT3, связанного с CD3ε (CD3ε:OKT). Показанная аминокислотная последовательность представляет остатки 2-93 105 остатков домена ECD CD3ε и соответствует остатам 1-91 CD3ε SEQ ID NO: 340. Одинарным подчеркиванием обозначены сегменты со снижением уровней дейтерирования на 10-30%, а двойным подчеркиванием - сегменты со снижением уровней дейтерирования на > 30% в присутствии антитела по сравнению с присутствием только CD3ε.

На **ФИГ. 8А** показана целевая цитотоксичность in vitro биспецифических молекул KL2BxCD3, измеренная с помощью системы визуализации incuCyte в режиме реального

времени для количественной оценки гибели клеток-мишеней.

На **ФИГ. 8B** показана целевая цитотоксичность in vitro биспецифических молекул KL2BxCD3, измеренная с помощью флуоресцентного реагента каспазы 3/7 для измерения сигнала апоптоза при гибели клеток-мишеней.

На **ФИГ. 9A** показана активация и пролиферация Т-клеток in vitro с помощью биспецифических антител KLK2xCD3 путем демонстрации частоты CD25-положительных клеток при разных дозах.

На **ФИГ. 9B** показана активация и пролиферация Т-клеток in vitro с помощью биспецифических антител KLK2xCD3 путем демонстрации частоты клеток, попадающих в гейт пролиферации.

На **ФИГ. 10A** показано высвобождение INF-γ Т-клетками in vitro с помощью биспецифических антител KLK2xCD3.

На **ФИГ. 10B** показано высвобождение TNF-α Т-клетками in vitro с помощью биспецифических антител KLK2xCD3.

На **ФИГ. 11** показан рисунок конструкции связывающих hK2 химерных искусственных рецепторов (CAR). ScFv, связывающий hK2, клонировали в ориентации VH-VL или VL-VH в различных CAR.

На **ФИГ. 12A и ФИГ. 12B** показана экспрессия CAR hK2 на поверхности Т-клеток. Первичные человеческие Т-клетки подвергали электропорации без мРНК (контроль) или в присутствии 10 мкг мРНК для экспрессии или scFv CAR к hK2, или нерелевантного контрольного CAR. Через сутки после электропорации экспрессию CAR на поверхности клеток измеряли с помощью проточной цитометрии после окрашивания с помощью 2 мкг/мл биотинилированного L-белка и конъюгированного со стрептавидином PE (верхняя панель) или 2 мкг/мл биотинилированного L-белка и конъюгированного со стрептавидином PE (нижняя панель) или биотинилированного hK2 (1 мкг/мл) и конъюгированного со стрептавидином PE.

На **ФИГ. 13** показана цитотоксичность для hK2-положительных (VCaP, верхняя панель) и отрицательных (DU145, нижняя панель) опухолевых клеток с использованием hK2 CAR-T-клеток во время 20-часового проточного анализа при указанном соотношении эффектор-мишень (E/T). Через сутки после временной трансфекции клетки-мишени метили флуоресцентным красителем Cell Trace Violet (CTV) и затем совместно культивировали с hK2 CAR-T-клетками. Контрольные Т-клетки служили отрицательным контролем эффектора. Процент уничтожения измеряли как отношение абсолютного числа живых (отрицательных по окрашиванию для оценки жизнеспособности клеток) (CTV-положительных) клеток-мишеней, оставшихся в совместной культуре, к числу живых мишеней, культивированных без CAR-T-клеток.

На **ФИГ. 14** показана цитотоксичность hK2 CAR-T-клеток в реальном времени. График нормализованного клеточного индекса (CI) для клеток-мишеней VCaP (5E4), инкубированных с контролем, hK2 11B6 CAR LH, подвергнутых электропорации с 10 мкг мРНК (через 24 часа после трансфекции), или Т-клетками с контрольным CAR при

различных соотношениях E/T в течение приблизительно 72 часов. При засеивании отдельно клетки-мишени, прикрепленные к планшету и пролиферированные, увеличивали показание CI. Когда Т-клетки добавляли к клеткам-мишеням, hK2 CAR и Т-клетки с контрольным CAR опосредовали hK2-положительный цитолиз VCaP-клеток и последующее постепенное снижение CI при соотношении E/T от 5 : 1 до 0,156 : 1. Снижение значения CI после добавления эффекторных клеток отражало потерю жизнеспособности клеток-мишеней. По оси Y показан нормализованный CI, полученный с помощью программного обеспечения RTCA и отображаемый в режиме реального времени. Ось X представляет собой время культивирования клеток и время обработки в часах. Средние значения CI наносили на график с учетом ± стандартного отклонения.

На **ФИГ. 15** показано отсутствие опосредованной hK2 CAR-Т-клетками цитотоксичности для клеток-мишеней, не экспрессирующих hK2, в режиме реального времени. График нормализованного клеточного индекса (CI) для клеток-мишеней DU145 (5E3), инкубированных с контролем, hK2 11B6 CAR LH, подвергнутым электропорации с 10 мкг мРНК (через 24 часа после трансфекции), или Т-клетками с контрольным CAR при различных соотношениях E/T в течение приблизительно 72 часов. При засеивании отдельно клетки-мишени, прикрепленные к планшету и пролиферированные, увеличивали показание CI. Когда Т-клетки добавляли к клеткам-мишеням, hK2 CAR-Т-клетки и Т-клетки с контрольным CAR не снижали показатель CI после добавления, что демонстрировало отсутствие цитолитической активности. По оси Y показан нормализованный CI, полученный с помощью программного обеспечения RTCA и отображаемый в режиме реального времени. Ось X представляет собой время культивирования клеток и время обработки в часах. Средние значения CI наносили на график с учетом ± стандартного отклонения.

На **ФИГ. 16** показана продукция интерферона-γ (IFN-γ) антиген-стимулированными hK2 CAR-Т-клетками. Супернатант собирали из киллинг-анализа на клеточном анализаторе xCELLigence через приблизительно 70 часов совместного культивирования (VCaP#5E4, DU145#5E3). hK2 CAR_LH и контрольные CAR-модифицированные Т-клетки секретировали IFN-γ при совместном культивировании с VCaP-клетками, экспрессирующими hK2, чего не отмечалось при совместном культивировании с hK2-отрицательными клетками DU145. Показана средняя концентрация IFN-γ с учетом ± стандартного отклонения (пг/мл) в культурах в двух повторностях.

На **ФИГ. 17** показана экспрессия конструктов hK2 CAR (конструкты 1-10) на клетках Jurkat, содержащих ген люциферазы, управляемая отвечающим на сигнал NFAT-промотором (клетки JNL), трансдуцированным различными hK2 CAR конструктами, как показано на фигуре. Экспрессию определяли с помощью биотинилированного hK2, а затем - конъюгированного со стрептавидином PE.

На **ФИГ. 18** показано связывание между конструктами CAR 1-10 и его распознанным клеточным антигеном (hK2 на клетках-мишенях), обнаруженным с

помощью экспрессии люциферазы в клетках JNL при связывании. Клетки JNL, трансдуцированные с указанными конструктами CAR (CAR 1-10), и нетрансдуцированные клетки JNL (UTD) совместно культивировали с линиями клеток-мишеней (VCaP или DU145 клетки), а активность люциферазы измеряли как интенсивность люминесценции. Конструкты считали активными, когда интенсивность люминесценции в присутствии экспрессирующих антиген клеток превышала уровень UTD-клеток в 1,5 раза.

На **ФИГ. 19** показана экспрессия hK2 CAR 1-10 или экспрессия родительских 11B6_HL и 11B6_LH на поверхности Т-клеток. Первичные Т-клетки человека трансдуцировали термически стабилизированным 11B6 и родительским лентивирусом scFv CR (множественность инфекции (MOI): 3), и экспрессию CAR определяли с помощью биотинилированного hK2 (1 мкг/мл), а затем конъюгированного со стрептавидином PE через 14 дней после трансдукции. UTD: нетрансдуцированный контроль.

На **ФИГ. 20** показан процент ингибирования роста опухолевых hK2-положительных VCaP клеток при соотношении эффектор/мишень от 1 : 1 или 0,5 : 1 под действием Т-клеток, трансдуцированных CAR 1-10, или родительских 11B6_HL или 11B6_LH во время киллинг-анализа на клеточном анализаторе IncuCyte в режиме реального времени, оценивавшем антиген-зависимую цитотоксичность. Ингибирование роста опухолевых клеток (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток*100 (%).

На **ФИГ. 21** показан процент ингибирования роста опухолевых PC3-клеток при соотношении эффектор/мишень 1 : 1 под действием Т-клеток, трансдуцированных CAR 1-10, или родительских 11B6_HL или 11B6_LH во время киллинг-анализа на клеточном анализаторе IncuCyte в режиме реального времени, оценивавшем антиген-зависимую цитотоксичность. Ингибирование роста опухолевых клеток (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток*100 (%).

На **ФИГ. 22** показано высвобождение цитокинов hK2 CAR-Т-клетками. Супернатант после совместного культивирования в течение ночи (приблизительно 20 часов) hK2 CAR-Т-клеток с VCaP клетками при соотношении E/T, равном 1 : 1, анализировали с использованием набора 13-plex Milliplex Human High Sensitivity T cell (HSTCMAG28SPMX13). hK2 CAR-Т-клетки секретировали цитокины во время совместного культивирования с VCaP клетками, экспрессирующими hK2, но секреция была минимальной во время совместного культивирования с нетрансдуцированными Т-клетками (UTD). Показана средняя концентрация цитокинов с учетом ± стандартного отклонения (пг/мл) для культур в двух повторностях.

На **ФИГ. 23** показано высвобождение IFN-γ hK2 CAR-Т-клетками. Супернатант собран после совместного культивирования в течение ночи (приблизительно 20 часов)

hK2 CAR-T-клеток с VCaP клетками, DU145 клетками (5E4) при соотношении E/T, равном 1 : 1. Модифицированные hK2 CAR T-клетки секретируют IFN-γ во время совместного культивирования с клетками VCaP, экспрессирующими hK2, чего не отмечается с hK2-отрицательными DU145 клетками. Показана средняя концентрация IFN-γ с учетом ± стандартного отклонения (пг/мл) в культурах в двух повторностях. В качестве положительного и отрицательного контролей использовались T-клетки, стимулированные микроносителями CD3/CD28, и только T-клетки, соответственно.

На **ФИГ. 24A** и **ФИГ. 24B** показаны гистограммы проточной цитометрии меченых флуоресцентным красителем Cell Trace Violet (CTV) нетрансдуцированных T-клеток (только T-клетки на фигуре) или CAR 1-10-трансдуцированных CAR-T-клеток после 5 дней совместного культивирования с VCaP или DU145 клетками или после стимуляции микроносителями CD3/CD28.

На **ФИГ. 25A** и **25B** показаны гистограммы проточной цитометрии меченных флуоресцентным красителем Cell Trace Violet (CTV) CD25-положительных нетрансдуцированных T-клеток (только T-клетки на фигуре) или CAR 1-10-трансдуцированных CAR-T-клеток после 5 дней совместного культивирования с VCaP или DU145 клетками или после стимуляции микроносителями CD3/28.

На **ФИГ. 26** показано, что после 5 дней совместного культивирования с VCaP клетками hK2 CAR-T-клетки пролиферировали более устойчиво, чем положительный контроль с микроносителями CD3/28. T-клетки, сконструированные с помощью различных конструктов CAR, имели другую активность пролиферации и демонстрировали различные количества CAR+ T-клеток. Количество CAR+ T-клеток получали на основании среднего значения абсолютного количества клеток + /-SEM из трех технических повторов.

На **ФИГ. 27** показана поверхностная экспрессия CAR17 (KL2B413_HL), CAR18 (KL2B413_LH), CAR19 (KL2B359_HL) и CAR20 (HK2B359_LH) на поверхности первичных T-клеток. Числа внутри каждой гистограммы указывают процент клеток, экспрессирующих указанные CAR.

На **ФИГ. 28** показана поверхностная экспрессия CAR17 (KL2B413_HL), CAR18 (KL2B413_LH), CAR19 (KL2B359_HL) и CAR20 (KL2B359_LH) на клетках JNL.

На **ФИГ. 29** показаны относительные световые единицы (RLU) в результате экспрессии люциферазы в клетках JNL, опосредованной связыванием исследуемой CAR-T-клетки с распознаваемым ею рецептором на различных клетках-мишенях, как показано на фигуре. Клетки JNL, содержащие указанные CAR клоны и нетрансдуцированные клетки JNL (UTD), совместно культивировали с линиями клеток-мишеней (клетками VCaP, LNCaP/hK2, LNCaP, C4-2B, 22Rv1 или DU145), а активность люциферазы измеряли как интенсивность люминесценции (RLU, относительные световые единицы). KL2B413_HL: CAR17, KL2B413_LH: CAR18, HL2B359_HL: CAR19, KL2B359_LH: CAR20.

На **ФИГ. 30** показан процент ингибирования роста опухолевых клеток, hK2-

положительных VCaP клеток, CAR-T-клетками, трансдуцированными CAR17 (B413LH на фигуре), CAR18 (B313LH на фигуре), CAR19 (B359HL на фигуре) и CAR20 (B359LH на фигуре) во время киллинг-анализа на клеточном анализаторе IncuCyte в режиме реального времени, оценивавшего антиген-зависимую цитотоксичность. Ингибирование роста опухолевых клеток (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток*100 (%).

На **ФИГ. 31** показан процент ингибирования роста опухолевых клеток, hK2-отрицательных DU145 клеток, CAR-T-клетками, трансдуцированными CAR17 (B413HL на фигуре), CAR18 (B313LH на фигуре), CAR19 (B359HL на фигуре) и CAR20 (B359LH на фигуре) во время киллинг-анализа на клеточном анализаторе IncuCyte в режиме реального времени, который оценивал антиген-зависимую цитотоксичность. Ингибирование роста опухолевых клеток (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток*100 (%).

На **ФИГ. 32** показана продукция IFN-γ CAR-T-клетками, трансдуцированными CAR17 (KLK2B413HL на фигуре), CAR18 (KLK2B413LH на фигуре), CAR19 (KLK2B35HL на фигуре) и CAR20 (KLK2B359LH на фигуре) или нетрансдуцированными Т-клетками (UTD) в совместных культурах с клетками, указанными на фигуре.

На **ФИГ. 33А** и **ФИГ. 33В** показано, что совместная культура CAR-T-клеток, трансдуцированных с CAR17 (B413HL на фигуре), CAR18 (B413LH на фигуре), CAR19 (B359HL на фигуре) и CAR20 (B359LH на фигуре), и клеток VCap дает увеличение CD107a+hK2-CAR-T+ клеток, что указывает на активацию иммунных клеток и цитотоксическую дегрануляцию, тогда как совместная культура с hK2-отрицательными DU145 клетками не давала эффекта.

На **ФИГ. 34А** и **ФИГ. 34В** показаны гистограммы проточной цитометрии меченных флуоресцентным красителем Cell Trace Violet (CTV) CD25-положительных нетрансдуцированных Т-клеток (только Т-клетки на фигуре) или CAR-T-клеток, трансдуцированных CAR17 (KLB413HL на фигуре), CAR18 (KLB313LH на фигуре), CAR19 (KLB359HL на фигуре) и CAR20 (KLB359LH на фигуре) после 5 дней совместного культивирования с клетками VCAp или DU145. UTD: нетрансдуцированные.

На **ФИГ. 35** показан процент пролиферирующих клеток в совместных культурах меченных флуоресцентным красителем Cell Trace Violet (CTV) CD25-положительных нетрансдуцированных Т-клеток (только Т-клетки на фигуре) или CAR-T-клеток, трансдуцированных CAR17 (KLB413HL на фигуре), CAR18 (KLB313LH на фигуре), CAR19 (KLB35HL на фигуре) и CAR20 (KLB359LH на фигуре), после 5 дней совместного культивирования с VCAP или DU145 клетками. UTD: нетрансдуцированные.

На **ФИГ. 36А** и **ФИГ. 36В** показаны гистограммы проточной цитометрии CTV+CD25+ CAR-T-клеток, трансдуцированных CAR17 (KLB413HL на фигуре), CAR18 (KLB413LH на фигуре), CAR19 (KLB359HL на фигуре) и CAR20 (KLB359LH на фигуре),

после 5 дней совместного культивирования с клетками VCaP или DU145.

На **ФИГ. 37** показан процент меченных флуоресцентным красителем CTV-экспрессирующих нетрансдуцированных Т-клеток (UTD) или CAR-T-клеток, трансдуцированных CAR17 (KLB413HL на фигуре), CAR18 (KLB413LH на фигуре), CAR19 (KLB359HL на фигуре) и CAR20 (KLB359LH на фигуре) после 5 дней совместного культивирования с клетками VCaP или DU145, отдельно (только Т-клетки) или после стимуляции микроносителями CD2/CD28.

На **ФИГ. 38A-38F** показан связывающий паратоп выбранных антител к hK2 и выбранных биспецифических антител к hK2/CD3. Подчеркнутые последовательности указывают на области CDR, а выделенные последовательности указывают на области паратопов. На Фиг. 38A раскрыты последовательности SEQ ID NO:219 и 220, соответственно, по порядку. На Фиг. 38B раскрыты последовательности SEQ ID NO:213 и 224, соответственно, по порядку. На Фиг. 38C раскрыты последовательности SEQ ID NO:203 и 215, соответственно, по порядку. На Фиг. 38D раскрыты последовательности SEQ ID NO:468 и 469, соответственно, по порядку. На Фиг. 38E раскрыты последовательности SEQ ID NO:354 и 221, соответственно, по порядку. На Фиг. 38F раскрыты последовательности SEQ ID NO:356 и 222, соответственно, по порядку.

На **ФИГ. 39A** показана эффективность in vivo биспецифического антитела KLK2xCD3 в модели с ксенотрансплантатами VCaP у мышей и профиль цитокинов. Три биспецифических антитела KLK2xCD3 тестировали в 3 дозах: 5 мг/кг, 1 мг/кг и 0,2 мг/кг. Ингибирование роста опухоли наносили на график по данным измерения объема опухоли.

На **ФИГ. 39B** показана эффективность in vivo биспецифического антитела KLK2xCD3 в модели с ксенотрансплантами VCaP у мышей и профили цитокинов. Образцы крови объемом 100 мкл отбирали у животных из ретроорбитального синуса через 6 часов после введения первой дозы. Плазму отделяли от крови с помощью высокоскоростного центрифугирования. Для количественного определения концентраций IFN- и TNF- α при разных дозах биспецифических антител к KLK2 использовали анализ Luminex.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Раскрываемые способы будут более понятны со ссылкой на приведенное ниже подробное описание в сочетании с прилагаемыми фигурами, которые являются частью настоящего раскрытия. Следует понимать, что описанные способы не ограничены конкретными способами, описанными и/или приведенными в настоящем документе, и что терминология, используемая в настоящем документе, имеет своей целью описание определенных вариантов осуществления исключительно в качестве примера и не призвана носить ограничивающий характер в отношении заявленных способов.

Все патенты, опубликованные заявки на патенты и публикации, процитированные в настоящем документе, включены в него путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе.

В случае представления списка, если не указано иное, следует понимать, что

каждый отдельный элемент этого списка и каждая комбинация из этого списка является отдельным вариантом осуществления. Например, список вариантов осуществления, представленный в виде «**A, B или C**», следует интерпретировать как список, включающий варианты осуществления «A», «B», «C», «A или B», «A или C», «B или C» или «A, B или C».

При использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если содержание текста четко не указывает на иное. Так, например, ссылка на «клетку» включает комбинацию двух или более клеток и т. п.

Переходные термины **«содержащий»**, **«состоящий по существу из»** и **«состоящий из»** предназначены для обозначения их по существу общепринятых патентных значений; т. е. (i) термин «содержащий», который является синонимом терминам «включающий», «содержащий» или «характеризующийся», является включающим или неограниченным и не исключает дополнительные, неуказанные элементы или стадии способа; (ii) «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в формуле изобретения; и (iii) «состоящий по существу из» ограничивает объем формулы изобретения конкретными материалами или стадиями «и тем, что не оказывает существенного влияния на основную (-ые) и новую (-ые) характеристику (-и)» заявленного изобретения. Варианты осуществления, описанные в отношении фразы «содержащий» (или его эквивалентов), обеспечивают такое же значение, как варианты осуществления, описанные независимо друг от друга в отношении фразы «состоящий из» и «состоящий по существу из».

Термин **«около»** означает «в пределах приемлемого диапазона ошибки» для конкретного значения, определенного обычным специалистом в данной области, причем ошибка отчасти зависит от того, каким образом измерено или определено это значение, т. е. от ограничений системы измерения. Если в примерах или в других разделах настоящего описания в контексте конкретного анализа, результата или варианта осуществления явным образом не указано иное, термин «около» означает «в пределах одного среднеквадратичного отклонения» в соответствии с практикой, принятой в данной области, или «в диапазоне до 5%», в зависимости от того, что больше.

Термин «**активация**» или «**стимуляция**» или «**активированный(-ая, -ые)**» или «**стимулированный(-ая, -ые)**» относится к индукции изменения биологического состояния клетки, что приводит к экспрессии маркеров активации, продукции цитокинов, пролиферации или опосредованной цитотоксичности клеток-мишеней; клетки могут активироваться первичными стимулирующими сигналами. Костимулирующие сигналы могут усиливать величину первичных сигналов и подавлять гибель клеток после начальной стимуляции, что приводит к более продолжительному состоянию активации и, таким образом, более высокой цитотоксической способности. Термин «**костимулирующий сигнал**» относится к сигналу, который в комбинации с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к пролиферации и/или активации Т-

клеток и/или NK-клеток и/или повышению или понижению экспрессии ключевых молекул.

Термин «**альтернативный каркас**» относится к одноцепочечному белковому каркасу, который содержит структурированную сердцевину, связанную с вариабельными доменами с высокой конформационной толерантностью. Вариабельные домены допускают изменение, внесенное без ущерба для целостности каркаса, и, следовательно, вариабельные домены можно конструировать и выбирать для связывания со специфическим антигеном.

Термин «**антителозависимая клеточная цитотоксичность**», **«антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность»** или «**ADCC**» относится к механизму индукции гибели клеток, которая зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с эффекторными клетками, обладающими литической активностью, например, натуральными клетками-киллерами (NK), моноцитами, макрофагами и нейтрофилами, посредством гамма-рецепторов Fc (FcγR), экспрессирующихся на эффекторных клетках.

Термин «**антителозависимый клеточный фагоцитоз**» или **ADCP** относится к механизму уничтожения покрытых антителами клеток-мишеней путем интернализации фагоцитарными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки.

Термин «**антиген**» обозначает любую молекулу (например, белок, пептид, полисахарид, гликопротеин, гликолипид, нуклеиновую кислоту, их части или их комбинации), способную связываться с антигенсвязывающим доменом или Т-клеточным рецептором, способным опосредовать иммунный ответ. Примеры иммунных ответов включают выработку антител и активацию иммунных клеток, таких как Т-клетки, В-клетки или NK-клетки. Антигены могут экспрессироваться генами, синтезироваться или быть полученными путем очистки из биологических образцов, таких как образец ткани, образец опухоли, клетка или жидкость с помощью других биологических компонентов, организмов, субъединиц белков/антигенов, убитых или инактивированных цельных клеток или лизатов.

«**Антигенсвязывающий фрагмент**» или «**антигенсвязывающий домен**» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая связывает антиген. Антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой синтетические, ферментативно получаемые или модифицированные методами генной инженерии полипептиды, и они включают части иммуноглобулина, которые связывают антиген, такие как VH, VL, VH и VL, фрагменты Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd и Fv, доменные антитела (dAb), состоящие из одного домена VH или одного домена VL, вариабельные домены IgNAR акулы, адаптированные к верблюду VH-домены, VHH-домены, минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих CDR-области антитела, например участки FR3-CDR3-FR4, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, а также LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3, альтернативные каркасы, которые связывают антиген, и мультиспецифические белки, содержащие антигенсвязывающие фрагменты.

Антигенсвязывающие фрагменты (такие как VH и VL) могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одиночных антител, в которых домены VH/VL можно объединять в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными цепями с образованием моновалентного антигенсвязывающего домена, такого как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело. Антигенсвязывающие фрагменты также могут конъюгироваться с другими антителами, белками, антигенсвязывающими фрагментами или альтернативными каркасом, которые могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими, с конструированием биспецифических и мультиспецифических белков.

Термин **«антитела»** подразумевается в широком значении и включает молекулы иммуноглобулинов, в том числе моноклональные антитела, включая мышиные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, мультиспецифические антитела, например биспецифические, триспецифические, тетраспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности. «Полноразмерные антитела» состоят из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области (VL) легкой цепи и константной области (CL) легкой цепи. Области VH и VL можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), между которыми расположены каркасные области (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от амино- к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам - IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, а именно, каппа (κ) и лямбда (λ).

Термин «**биспецифический**» относится к молекуле (такой как антитело), которая специфически связывается с двумя разными антигенами или двумя разными эпитопами в пределах одного антигена. Биспецифическая молекула может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, Macaca cynomolgus (яванский макак, крабоед) или Pan troglodytes, или может связывать эпитоп, который

имеется в двух или более разных антигенах.

Термин «**биспецифическое антитело к hK2/CD3**», «**антитело к hk2/CD3**», «**антитело hk2xCD3**», «**антитело к hK2/антитело к CD3 белку» и** т. д. относится к антителу, которое связывает hk2 и CD3, и содержит по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий hK2, и по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий CD3. Домены, специфически связывающие hK2 и CD3, как правило, представляют собой пары V_H/V_L. Биспецифическое антитело к hk2×CD3 может быть моновалентным с точки зрения его связывания или с hk2, или с CD3.

Термин **«рак»** обозначает широкую группу различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом ненормальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводят к образованию злокачественных опухолей, которые прорастают в соседние ткани и также могут метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровоток. «Рак» или «раковая ткань» может включать в себя опухоль.

Термин «**химерный антигенный рецептор**» (CAR), используемый в настоящем документе, определяется как клеточный рецептор, содержащий внеклеточный мишень-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, образующие комбинацию, которая в природе не встречается на одном белке. Сюда относятся рецепторы, в которых внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен в природе не встречаются на белке одного рецептора. CAR предназначены главным образом для применения с лимфоцитами, такими как Т-клетки и натуральные киллеры (NK).

Термин «**комплемент-зависимая цитотоксичность**» или «**CDC**», относится к механизму индукции гибели клеток, в рамках которого эффекторный домен Fc связанного с мишенью антитела связывает и активирует компонент комплемента C1q, который, в свою очередь, активирует каскад комплемента, приводящий к гибели клетки-мишени. Активация комплемента может также приводить к осаждению компонентов комплемента на поверхности клеток-мишеней, что облегчает CDC посредством связывания на лейкоцитах рецепторов комплемента (например, CR3).

Термин «**определяющие комплементарность области** (CDR) относится к областям антител, которые связывают антиген. Существуют три CDR в области VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три CDR в области VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3). CDR можно определить с помощью различных схем, например, по Кабат (Wu et al. (1970) J Exp Med 132: 211-50; Kabat et al Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), Chothia (Chothia et al. (1987) J Mol Biol 196: 901-17), IMGT (Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27: 55-77) и AbM (Martin and Thornton J Bmol Biol 263: 800-15, 1996). Описано соответствие между различными системами разграничения и нумерациями вариабельных областей (см., например, Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27: 55-77; Honegger and Pluckthun, J Mol Biol (2001) 309:657-70; база данных International ImMunoGeneTics (IMGT); веб-ресурсы,

http://www_imgt_org). Для разметки CDR можно использовать доступные программы, такие как abYsis от UCL Business PLC. Используемые в настоящем документе термины «CDR», «HCDR1», «HCDR2», «HCDR3», «LCDR1», «LCDR2» и «LCDR3» включают в себя CDR, определенные любым из способов, описанных выше, по Кабат, Чотиа, IMGT или AbM, если в описании явным образом не указано иное.

Термин «**CD3**» относится к антигену, который экспрессируется на Т-клетках в составе мультимолекулярного комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) и который состоит из гомодимера или гетеродимера, образованного в результате ассоциации двух или четырех цепей рецептора: CD3-эпсилон, CD3-дельта, CD3-дзета и CD3-гамма. CD3-эпсилон человека содержит аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO**: **442.** Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белка в данном документе предназначены для обозначения человеческой версии соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они принадлежат к отличным от человека видам. Таким образом, « CD3 » означает человеческий CD3, если не указано, что он получен от видов, отличных от человека, например, «мышиный CD3», «обезьяний CD3» и т. д.

В настоящем описании термины «**CD3-специфический**» или «**специфически связывает CD3**» или «**антитело к CD3**» относится к антителам, которые специфически связываются с полипептидом CD3-эпсилон (**SEQ ID NO:442**), включая антитела, которые специфически связываются с внеклеточным доменом CD3-эпсилон (ВКД) (**SEQ ID NO:443**). CD3-эпсилон, вместе с CD3-гамма, -дельта и -дзета, а также гетеродимерами Т-клеточных рецепторов альфа/бета и гамма/дельта, образуют комплекс Т-клеточный рецептор - CD3. Этот комплекс играет важную роль в связывании распознавания антигена с несколькими внутриклеточными путями сигнальной трансдукции. Комплекс CD3 опосредует трансдукцию сигнала, что приводит к активации Т-клеток и пролиферации. Для иммунного ответа необходим CD3.

SEQ ID NO: 442 (CD3-эпсилон человека)

MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPG
SEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLY
LRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGG
RQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI

SEQ ID NO: 443 (внеклеточный домен CD3-эпсилон человека)

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGS
DEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD

Термин «**уменьшение**», «**более низкий**» «**уменьшать**», «**снижать**» или «**угнетать**» относится по существу к способности тестируемой молекулы опосредовать сниженный ответ (*т. е.*, эффект на последующих стадиях) по сравнению с ответом, который опосредован контролем или носителем. Иллюстративные ответы представляют собой размножение Т-клеток, активацию Т-клеток или опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток или связывание белка с его антигеном или рецептором,

усиленное связывание с Fcγ или улучшенными эффекторными функциями Fc, такими как улучшенная ADCC, CDC и/или ADCP. Уменьшение может представлять собой статистически значимое различие в измеренном ответе между тестовой молекулой и контролем (или носителем) или снижением измеренного ответа, например, уменьшением в около 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 30 раз или более, например, в 500, 600, 700, 800, 900, 1000 раз или более (включая все целые числа и десятичные точки в интервале между и более 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.).

Термин «**дифференциация**» относится к способу уменьшения потенциала или пролиферации клетки или переходу клетки в состояние, более ограниченное с точки зрения развития.

Термин «**кодировать**» или «**кодирующий**» относится к свойству, присущему конкретным последовательностям нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих или определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и мРНК), или определенной последовательности аминокислот, а также к биологическим свойствам, полученным в результате этого. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодируют белок, если в результате транскрипции и трансляции мРНК, соответствующей этому гену, вырабатывается белок в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут называться кодирующими белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Термин «**усилить**», «**активировать**», « **увеличить**», «**расширить**» или «**улучшить**» относится по существу к способности исследуемой молекулы опосредовать более высокий ответ (*т. е.,* эффект на последующих стадиях) по сравнению с ответом, который опосредован контролем или носителем. Иллюстративные ответы представляют собой размножение Т-клеток, активацию Т-клеток или опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток или связывание белка с его антигеном или рецептором, усиленное связывание с Fcγ или улучшенными эффекторными функциями Fc, такими как улучшенная ADCC, CDC и/или ADCP. Усиление может представлять собой статистически значимое различие в измеренном ответе между исследуемой молекулой и контролем (или носителем) или повышением измеренного ответа, например, повышением в около 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 30 раз или более, например, в 500, 600, 700, 800, 900, 1000 раз или более (включая все целые числа и десятичные точки в интервале между и более 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.).

Термин «**эпитоп**» означает часть антигена, с которым специфически связывает антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных группировок фрагментов, таких как боковые цепи аминокислот или полисахаридов, и могут иметь конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные характеристики заряда. Эпитоп может быть

образован из непрерывных и/или прерывающихся аминокислот, формирующих конформационное пространственное звено. В случае прерывающегося эпитопа аминокислоты из разных частей линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в 3-мерном пространстве посредством сворачивания молекулы белка. «Эпитоп» антитела зависит от методологии, применяемой для выявления эпитопа.

Термин «**рост**» обозначает результат деления и гибели клеток.

Термин «**экспрессировать**» и «**экспрессия**» относится к хорошо изученной транскрипции и трансляции, происходящей в клетках или in vitro. Таким образом, продукт экспрессии, *например* белок, экспрессируется клеткой или in vitro и может представлять собой внутриклеточный, внеклеточный или трансмембранный белок.

Термин **«экспрессионный вектор»** относится к вектору, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для управления трансляцией полипептида, кодируемого полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в экспрессионном векторе.

Термин «**dAb**» или «**фрагмент dAb**» относится к фрагменту антитела, состоящего из домена VH (Ward et al., Nature 341:544 546 (1989)).

Термин «**Fab**» или «**Fab-фрагмент**» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VH, CH1, VL и CL.

Термин «**$F(ab')_2$**» или «**$F(ab')_2$ фрагмент**» относится к фрагменту антитела, содержащему два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области.

Термин «**Fd**» или «**Fd фрагмент**» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VH и CH1».

Термин «**Fv**» или «**Fv-фрагмент**» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VH и VL из одного плеча антитела. Fv фрагменты не содержат константных областей Fab (CH1 и CL). Домены VH и VL в Fv фрагментах удерживаются вместе за счет нековалентного взаимодействия.

Термин «**Fc полипептид**» димерного Fc относится к одному из двух полипептидов, образующих димерный домен Fc. Например, Fc полипептид димерного IgG FC содержит IgG CH2 и IgG CH3 последовательности константного домена).

«**Полноразмерное антитело**» состоит из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и константного домена тяжелой цепи, состоящей из субдоменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельного домена легкой цепи (VL) и константного домена легкой цепи (CL). VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), между которыми располагаются каркасные области (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от амино- к карбокси-концу в следующем порядке:

FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Термин «**генетическая модификация**» относится к введению «чужеродного» (*т. е.*, внешнего или внеклеточного) гена, последовательности ДНК или РНК в клетку-хозяина таким образом, чтобы клетка-хозяин экспрессировала введенный ген или последовательность для получения желаемого вещества, обычно белка или фермента, кодируемого введенным геном или последовательностью. Введенный ген или последовательность также можно назвать «клонированным» или «чужеродным» геном или последовательностью, которые могут включать регуляторные или контрольные последовательности, функционально связанные с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор, такие как последовательность запуска, последовательность остановки, промотор, сигнальная последовательность, секреторная последовательность или другие последовательности, используемые генетическим механизмом клетки. Ген или последовательность могут включать нефункциональные последовательности или последовательности без известной функции. Клетка-хозяин, принимающая и экспрессирующая указанную ДНК или РНК, является «генетически сконструированной». ДНК или РНК, введенная в клетку-хозяин, может поступать из любого источника, включая клетки одного рода или вида, выступающего в качестве клетки-хозяина, или разных родов или видов.

Термин «**гетерологичный**» относится к двум или более полинуклеотидам или двум или более полипептидам, не находящимся в одинаковых отношениях друг к другу в природе.

Термин «**гетерологичный полинуклеотид**» относится к не встречающемуся в природе полинуклеотиду, который кодирует два или более неоантигенов, как описано в настоящем документе.

Термин «**гетерологичный полипептид**» относится к не встерчающемуся в природе полипептиду, содержащему два или более неоантигенных полипептида, как описано в настоящем документе.

Термин «**клетка-хозяин**» обозначает любую клетку, которая содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. Типичная гетерологичная нуклеиновая кислота представляет собой вектор (*например*, вектор экспрессии).

Термин **«человеческое антитело»** относится к антителу, которое оптимизировано для обеспечения минимального иммунного ответа при введении человеческому индивиду. Вариабельные области человеческого антитела получают из последовательностей иммуноглобулинов человека. Если антитело содержит константную область или часть константной области, константную область также получают из последовательностей иммуноглобулинов человека. Человеческое антитело содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи, которые «получены из» последовательностей человеческого происхождения, если вариабельные области человеческие антитела получены из системы, в которой используют иммуноглобулин зародышевой линии человека или перестроенные гены иммуноглобулина. Такими примерами систем являются библиотеки генов

человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенные животные, отличные от человека, такие как мыши или крысы, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов. «Человеческое антитело», как правило, содержит аминокислотные отличия по сравнению с иммуноглобулинами, экспрессируемыми у людей, из-за различий между системами, используемыми для получения человеческих антител и локусов человеческих иммуноглобулинов, внедрения соматических мутаций, намеренного введения замен в каркасные участки и/или CDR, или и то и другое. Как правило, «человеческое антитело» по аминокислотной последовательности на по меньшей мере около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой генами иммуноглобулина зародышевой линии человека или перестроенными генами иммуноглобулина. В некоторых случаях «человеческое антитело» может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов каркасных последовательностей человека, например, как описано в Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86, или синтетическую HCDR3, включенную в библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемых на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385-96 и международной публ. пат. №WO2009/085462. Антитела, в которых по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, не подходят под определение антитела человека.

Термин **«гуманизированное антитело»** относится к антителу, в котором по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, а по меньшей мере один каркас получен из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может включать замены в каркасных областях, в результате чего каркасы могут не быть точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или человеческих генных последовательностей зародышевой линии.

Выражение «**в комбинации с**» означает, что два или более терапевтических агента вводят субъекту вместе в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке.

Термин «**внутриклеточный сигнальный домен**» или «**цитоплазматический сигнальный домен**» обозначает внутриклеточную часть молекулы. Именно функциональный участок белка действует путем передачи информации внутри клетки для регуляции клеточной активности через определенные сигнальные пути, генерируя вторичные мессенджеры или действуя как эффекторы, отвечая на такие мессенджеры. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который вызывает иммунную эффекторную функцию клетки, содержащей CAR, например, CAR-T-клетки.

Термин «**выделенный**» относится к однородной популяции молекул (таких как синтетические полинуклеотиды или полипептиды), которые были по существу отделены и/или очищены от других компонентов той системы, в которой данные молекулы

формировались, такой как рекомбинантная клетка, а также к белку, который был подвергнут по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Термин «выделенное» относится к антителу, которое по существу не содержит иных клеточных материалов и/или химических веществ, и охватывает молекулы, которые выделены с большей чистотой, такой как 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% чистотой.

Термин «**родственная калликреину пептидаза 2**» «**hK2**» относится к изученному белку, который также называется калликреином-2, эндокринным калликреином-2 или hK2. hK2 получают в виде препропротеина и расщепляют во время протеолиза для получения активной протеазы. Все изоформы и варианты hK2 включены в термин «hK2». Аминокислотные последовательности различных изоформ извлекают из номеров доступа в GenBank NP_005542.1, NP_001002231.1 и NP_001243009. Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого hK2 приведена в SEQ ID NO: 62. Последовательность включает сигнальный пептид (остатки 1-18) и пропептидную область (остатки 19-24).

SEQ ID NO: 62

MWDLVLSIALSVGCTGAVPLIQSRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGG
VLVHPQWV

LTAAHCLKKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPD
EDSSHD

LMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLRPRSLQCVSL
HLLS

NDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPLVCNGVLQGITSWGPE
PCALPEKP

AVYTKVVHYRKWIKDTIAANP

Термин «**модулятор**» относится к повышенной или пониженной способности тестируемой молекулы опосредовать усиленный или ослабленный ответ (*т. е.*, эффект на последующих стадиях) по сравнению с ответом, который опосредован контролем или носителем.

Термин **«моноклональное антитело»** относится к антителу, полученному из по существу гомогенной популяции молекул антител, т. е. отдельных антител, составляющих популяцию, идентичных за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление С-концевого лизина из тяжелой цепи антитела или посттрансляционные модификации, такие как изомеризация или дезамидирование аминокислот, окисление метионина или аспарагина или дезамидирование глутамина. Моноклональные антитела обычно связывают один антигенный эпитоп. Биспецифические моноклональные антитела связываются с двумя разными антигенными эпитопами. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, например биспецифическим, моновалентным, двухвалентным или мультивалентным.

Термин «**мультиспецифический**» относится к молекуле, например, антителу, которая специфически связывается с двумя или более разными антигенами или двумя или более разными эпитопами в пределах одного антигена. Мультиспецифическая молекула может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, Macaca fascicularis (яванский макак, макак) или Pan troglodytes, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Термины «**клетка-натуральный киллер**» и «**NK-клетка**» используются взаимозаменяемо и являются синонимами в настоящем документе. Термин «NK-клетка» относится к дифференцированному лимфоциту с фенотипом $CD16^+$ $CD56^+$ и/или $CD57^+$ TCR^-. NK-клетки характеризуются способностью связываться с клетками, которые не экспрессируют «собственные» антигены MHC/HLA, и уничтожать их путем активации специфических цитолитических ферментов, способностью уничтожать опухолевые клетки или другие пораженные клетки, которые экспрессируют лиганд для рецепторов, активирующих NK-клетки, а также способностью высвобождать молекулы белка, называемые цитокинами, которые стимулируют или ингибируют иммунный ответ.

Термин «**функционально связанный**» и аналогичные фразы, при их использовании в отношении нуклеиновых кислот или аминокислот, относятся к фактической связи последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотной последовательности, соответственно, в функциональных отношениях друг с другом. Например, функционально связанный промотор, энхансер, открытая рамка считывания, 5-штрих и 3-штрих нетранслируемая область (UTR) и последовательности терминации приводят к точной продукции молекулы нуклеиновой кислоты (например, РНК) и в некоторых случаях к продукции полипептида (т. е., экспрессии открытой рамки считывания). Функционально связанный пептид относится к пептиду, в котором функциональные домены пептида размещены на соответствующем расстоянии друг от друга для того, чтобы наделить каждый домен предполагаемой функцией.

Термин «**паратоп**» относится к участку или области молекулы антитела, которые участвуют в связывании антигена и содержат остатки, взаимодействующие с антигеном. Паратоп может быть образован из непрерывных и/или прерывающихся аминокислот, формирующих конформационное пространственное звено. Паратоп для данного антитела может быть определен и охарактеризован на разных уровнях детализации с использованием различных экспериментальных и вычислительных способов. Экспериментальные способы включают масс-спектрометрию с водородно-дейтериевым обменом (HX-MS). Паратоп будет определяться по-разному в зависимости от используемого способа сопоставления.

Термин «**фармацевтическая комбинация**» обозначает комбинацию двух или более активных ингредиентов, вводимых либо вместе, либо отдельно.

Термин «**фармацевтическая композиция**» относится к композиции, которая получается при комбинации активного ингредиента и фармацевтически приемлемого

носителя.

Термин **«фармацевтически приемлемый носитель»** или «эксципиент» относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, за исключением активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают в себя буфер, стабилизатор или консервант.

Термин **«полинуклеотид»** или «**нуклеиновая кислота**» относится к синтетической молекуле, содержащей цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. кДНК является типичным примером полинуклеотида. Полинуклеотид может представлять собой ДНК или молекулу РНК.

Термины «**предотвращать**», «**предотвращение**», «**предупреждение**» или «**профилактика**» заболевания или расстройства означают предотвращение возникновения у субъекта расстройства.

Термин «**пролиферация**» относится к увеличению деления клеток, симметричному или асимметричному разделению клеток.

Термин «**промотор**» обозначает минимальные последовательности, необходимые для инициации транскрипции. Промотор также может включать энхансеры или репрессоры, которые усиливают или подавляют транскрипцию, соответственно.

Термин «**белок**» или «**полипептид**», используемый в настоящем документе, относится к молекуле, которая содержит один или более полипептидов, каждый из которых состоит из по меньшей мере двух аминокислотных остатков, связанных пептидной связью. Белок может представлять собой мономер или белковый комплекс двух или более субъединиц, причем субъединицы идентичны или отличаются друг от друга. Малые полипептиды, содержащие менее 50 аминокислотных остатков, могут называться «пептидами». Белок может представлять собой гетерологичный слитый белок, гликопротеин или белок, модифицированный посттрансляционными модификациями, такими как фосфорилирование, ацетилирование, миристиолирование, пальмитоилирование, гликозилирование, окисление, формилирование, амидирование, цитруллинирование, полиглутамилирование, АДФ-рибозилирование, пегилирование или биотинилирование. Белок может быть рекомбинантно экспрессированным.

Термин «**рекомбинантный**» относится к полинуклеотидам, полипептидам, векторам, вирусам и другим макромолекулам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами.

Термин «**регуляторный элемент**» относится к любому генетическому элементу, действующему в цис- или транс-положении, который контролирует некоторые аспекты экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот.

Термин «**рецидивирующий**» относится к повторному возникновению заболевания или признаков и симптомов заболевания после периода улучшения после предшествующего лечения терапевтическим средством.

Термин **«рефрактерный»** относится к заболеванию, которое не реагирует на

лечение. Рефрактерное заболевание может быть устойчивым к лечению до или в начале лечения или рефрактерное заболевание может стать устойчивым во время лечения.

Термин «**одноцепочечный Fv**» или «**scFv**» относится к слитому белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, включающего вариабельную область легкой цепи (VL), и по меньшей мере один фрагмент антитела, включающий вариабельную область тяжелой цепи (VH), причем VL и VH непрерывно соединены посредством полипептидного линкера и способны экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида. Если не указано иное, в контексте данного документа scFv может иметь вариабельные области VL и VH в любом порядке, например, относительно N-терминального и C-терминального концов полипептида, scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL.

Фрагменты «**$(scFv)_2$**» или «**тандемный scFv**», или «**бис-scFv**» представляют собой слитый белок, содержащий две вариабельные области легкой цепи (VL) и две вариабельные области тяжелой цепи (VH), причем две области VL и две области VH непрерывно связаны посредством полипептидных линкеров и способны экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида. Две области VL и две области VH, сшитые пептидными линкерами, образуют двухвалентную молекулу VL_A-линкер-VH_A-линкер-VL_B-линкер-VH_B с образованием двух сайтов связывания, способных одновременно связываться с двумя разными антигенами или эпитопами.

Термины «**специфически связывается**», **«специфическое связывание»**, **«специфически связывает»** или **«связывает»** относятся к связыванию белковой молекулы с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем у других антигенов. Как правило, белковая молекула связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с равновесной константой диссоциации (K_D) около 1×10^{-7} М или менее, например около 5×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее или около 1×10^{-12} М или менее, как правило, со значением K_D, которое по меньшей мере в сто раз ниже его значения K_D связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином). В контексте неоантигенов предстательной железы, описанных в настоящем документе, термин «специфическое связывание» относится к связыванию белковой молекулы с неоантигеном предстательной железы без обнаружимого связывания с белком дикого типа, вариантом которого является неоантиген.

Термин **«субъект»** включает любого человека или не относящееся к человеку животное. Термин «не относящееся к человеку животное» включает в себя всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т. д. Термины «индивид» и «пациент» в настоящем документе могут применяться взаимозаменяемо.

Термины «**Т-клетка**» и «**Т-лимфоцит**» являются взаимозаменяемыми и используются в настоящем документе как синонимы. Т-клетка включает тимоциты, наивные Т-лимфоциты, Т-клетки памяти, незрелые Т-лимфоциты, зрелые Т-лимфоциты,

покоящиеся Т-лимфоциты или активированные Т-лимфоциты. Т-клетка может представлять собой клетку Т-хелпер (Th), например Т-хелпер 1 (Th1) или Т-хелпер 2 (Th2). Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (HTL; $CD4^+$ Т-клетка) $CD4^+$ Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку (CTL; $CD8^+$ Т-клетка), инфильтрирующую опухоль цитотоксическую Т-клетку (TIL; $CD8^+$ Т-клетка), $CD4^+CD8^+$ Т-клетку или любую другую подгруппу Т-клеток. Также включены «NKT-клетки», относящиеся к специализированной популяции Т-клеток, которые экспрессируют полуинвариантный αβ Т-клеточный рецептор, но также экспрессируют различные молекулярные маркеры, которые, как правило, ассоциированы с Nk-клетками, такими как NK1.1. NKT-клетки включают $NK1.1^+$ и $NK1.1^-$, а также клетки $CD4^+$, $CD4^-$, $CD8^+$ и $CD8^-$. TCR на NKT-клетках уникален тем, что он распознает гликолипидные антигены, презентированные подобной ГКГС I молекулой CD Id. NKT-клетки могут иметь как защитные, так и вредные эффекты из-за их способности продуцировать цитокины, которые способствуют воспалению или иммунной толерантности. Также включены «гамма-дельта-Т-клетки (γδ Т-клетки)», которые относятся к специализированной популяции, а именно к небольшой подгруппе Т-клеток, имеющей на своей поверхности отдельный TCR, и в отличие от большинства Т-клеток, в которых TCR состоит из двух гликопротеиновых цепей, обозначенных как α- и β-цепи TCR, Т-клеточный рецептор в Т-клетках γδ состоит из γ-цепи и δ-цепи. Т-клетки γδ могут играть роль в иммунонадзоре и иммунорегуляции, и было обнаружено, что они являются важным источником IL-17 и индуцируют устойчивый цитотоксический $CD8^+$ Т-клеточный ответ. Также включены «регуляторные Т-клетки» или «Трег», которые относятся к Т-клеткам, которые подавляют аномальный или избыточный иммунный ответ и играют роль в иммунной толерантности. Treg обычно представляют собой Foxp3-положительные $CD4^+$Т-клетки и могут также включать Foxp3-отрицательные регуляторные Т-клетки, которые представляют собой IL-10-продуцирующие $CD4^+$Т-клетки.

Термины «**терапевтически эффективное количество**» или «**эффективное количество**», которые являются взаимозаменяемыми в настоящем документе, относятся к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желательного терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела субъекта, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать у субъекта желаемый ответ. Пример показателей эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств включают в себя, например, улучшение состояния здоровья пациента, сокращение размера опухоли, прекращение или замедление роста опухоли и/или отсутствие метастазирования раковых клеток в другие участки организма.

Термин «**трансдукция**» относится к введению чужеродной нуклеиновой кислоты в клетку с использованием вирусного вектора.

Термины «**лечить**», «**лечение**» или «**терапия**» заболевания или расстройства,

такого как рак, относятся к достижению одной или более следующих целей: уменьшение тяжести и/или продолжительности расстройства, замедление нарастания выраженности симптомов, характерных для этого расстройства, ограничение или предотвращение рецидива расстройства у субъектов, которые ранее страдали расстройством, либо ограничение или предотвращение рецидива симптомов у субъектов с ранее проявлявшимися симптомами расстройства.

Термин «**опухолевая клетка**» или «раковая клетка» относится к раковой, предраковой или трансформированной клетке, либо in vivo, ex vivo, либо в культуре тканей, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения. Эти изменения не обязательно затрагивают поступление нового генетического материала. Хотя трансформация может быть вызвана инфекцией трансформирующим вирусом и встраиванием новой геномной нуклеиновой кислоты, поглощением экзогенной нуклеиновой кислоты или она также может возникать спонтанно или после воздействия канцерогена, в результате чего происходит мутация эндогенного гена. Трансформация/рак проявляются в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образовании очагов, пролиферации, злокачественности, модулировании уровней маркера, специфичных для опухоли, инвазивности, росте опухоли у приемлемых животных-хозяев, таких как бестимусные мыши и т. п., in vitro, in vivo и ex vivo.

Термины «**вариант**», «**мутант**» или «**измененный**» относятся к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификациями, например одной или более заменами, вставками или делециями.

Нумерация аминокислотных остатков в константной области антитела в тексте описания приведена в соответствии с каталогом EC, как описано в публикации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), если явно не указано иное.

Мутации в константных областях Ig называются следующим образом: L351Y_F405A_Y407 V относится к мутациям L351Y, F405A и Y407 V в одной константной области иммуноглобулина. L351Y_F405A_Y407 V/T394W относится к мутациям L351Y, F405A и Y407 V в первой константной области Ig, а мутации T394W - во второй константной области Ig, которые присутствуют в одном мультимерном белке.

Термин «VHH» относится к однодоменному антителу или нанотелу, состоящему исключительно из антигенсвязывающего домена тяжелой цепи. Однодоменные антитела VHH не имеют легкой цепи и домена CH1 тяжелой цепи традиционной области Fab.

КОМПОЗИЦИИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Антигенсвязывающие домены, которые связываются с hK2

В настоящем изобретении предложены антигенсвязывающие домены, которые связываются с hK2, моноспецифические и мультиспецифические белки (в частности, биспецифические белки), содержащие антигенсвязывающие домены, которые связываются с hK2, химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие

антигенсвязывающие домены, которые связываются с hK2, полинуклеотиды, кодирующие указанные выше соединения, векторы, клетки-хозяева и способы получения и применения указанных выше соединений. Антигенсвязывающие домены, которые связываются с hK2 и идентифицированы в настоящем документе, продемонстрировали улучшенные свойства в виде улучшения термостабильности. Мультиспецифические белки, описанные в настоящем документе, могут быть особенно эффективными в опосредовании цитотоксичности, запускаемой Т-клетками, стимулировании активации и пролиферации Т-клеток, увеличении высвобождения цитокинов, секретируемых Т-клетками, и/или демонстрации повышенной противоопухолевой эффективности.

Данное изобретение относится к выделенному белку, содержащему антигенсвязывающий домен, связывающий родственную калликреину пептидазу 2 (hK2), причем антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, связывается с эпитопом на hK2, приведенном в SEQ ID NO: 111, 112, 113, 114, или 115.

В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, связывается с эпитопом на hK2, приведенном в SEQ ID NO: 111 и 112.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, связывается с эпитопом на hK2, приведенном в SEQ ID NO: 113, 114 и 115.

В изобретении также предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается в пределах остатков KVTEF (SEQ ID NO: 111) или HYRKW (SEQ ID NO: 112) или SHGWAH (SEQ ID NO: 113) или RHNLFEPEDTGQRVP (SEQ ID NO: 114) или GWGSIEPEE (SEQ ID NO: 115 hK2. В конкретном варианте осуществления в изобретении также предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем указанный антигенсвязывающий домен связывается с hK2 в эпитопах, имеющих последовательности KVTEF (SEQ ID NO: 111) или HYRKW (SEQ ID NO: 112).

Анализ H/D обмена можно использовать для определения остатков в пределах hK2, с которыми связывается антитело. При анализе H/D обмена рекомбинантно экспрессированный растворимый hK2 инкубируют в присутствии или в отсутствие антитела в дейтерированной воде в течение заданного времени, что приводит к включению дейтерия в обмениваемые атомы водорода, не защищенные антителом, с последующим расщеплением белка протеазой и анализом пептидных фрагментов методом ЖХ-МС. Анализ H/D обмена можно проводить с использованием известных протоколов. Иллюстративный протокол описан в примере 3. В некоторых вариантах осуществления смесь для обмена H/D гасят путем добавления буфера для гашения (*например* 8 М мочевина, 1М TCEP, pH 3,0) перед пропусканием через уравновешенную колонку с иммобилизованным пепсином/FPXIII при комнатной температуре (*например,* 600 мкл/мин). Затем пептические фрагменты загружают в обращенно-фазную предколонку (*например,* при 600 мкл/мин) и обессоливают (*например,* в течение 1 мин при 600 мкл),

разделяют (*например,* на колонке C18) и анализируют с помощью масс-спектрометрии (*например,* с использованием масс-спектрометра LTQ™ Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific) при температуре капилляра 275 °C, разрешением 150 000 и диапазоном масс (масса/заряд) 300-1800).

В изобретении также предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, причем антигенсвязывающий домен указанного эталонного антитела связывается с эпитопом на hK2, имеющим последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 111,112,113,114 и 115, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, конкурирует за связывание с hK2 с эталонным антителом, описанном в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело содержит:

a. HCDR1, HCDR2 HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 137 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 138; или

b. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 162 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163; или

c. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 164 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 165; или

d. HCDR1, HCDR2 HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 166 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 167; или

e. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 168 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 169; или

f. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 204 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 205; или

g. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 166 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 444.

В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 162 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163.

Конкуренцию за связывание исследуемого антитела, которое связывается с SEQ ID NO: 111, 112, 113, 114 или 115 растворимого hK2 с эталонными антителами по настоящему изобретению можно проанализировать in vitro с использованием хорошо

известных способов. Например, связывание меченого антитела с мембранной проксимальной областью hK2 в присутствии немеченого эталонного антитела можно оценить при помощи твердофазного ИФА, или Bioacore, или при помощи проточной цитометрии для демонстрации конкуренции. Исследуемое антитело конкурирует за связывание с hk2 с эталонным антителом, если исследуемое антитело ингибирует связывание эталонного антитела с растворимым hk2 на 85% или более, например, на 90% или более, или 95% или более.

В настоящем изобретении предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 137 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 138; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 137 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 138; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 162 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 164 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 165; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 166 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 167; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 168 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 169; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 204 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 205. В конкретном варианте осуществления предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит HCDRR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 162 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163.

В настоящем изобретении предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностями

SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69, и 71, соответственно;

SEQ ID NO: 63, 65, 66, 68, 70, и 71, соответственно;
SEQ ID NO: 72, 73, 66, 67, 69, и 71, соответственно;
SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно;
SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно;
SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно.
SEQ ID NO: 170 183, 184, 185, 186, 37 и 187, соответственно;
SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192, и 193, соответственно;
SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, и 209, соответственно;
SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно;
SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174, и 175, соответственно;
SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 180, и 181, соответственно;
SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186, и 187, соответственно;
SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192, и 193, соответственно; или
SEQ ID NO: 216, 217, 218, 182, 470 и 209, соответственно.

В конкретном варианте осуществления изобретения предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

В настоящем изобретении предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит VH SEQ ID NO: 137, 162, 164, 166, 168 или 204 и вариабельную область легкой цепи (VH) с последовательностями SEQ ID NO: 138, 163, 165, 167 или 169.

В настоящем изобретении предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит

VH с SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138;
VH с SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163;
VH с SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165;
VH с SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167;
VH с SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169; или
VH с SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205.

В конкретном варианте осуществления изобретения предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем

антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В настоящем изобретении также предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 95% идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 95% идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 99% идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 99% идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 99% идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 99% идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична VL SEQ ID NO: 163.

В настоящем изобретении предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, 134, 308, 316, 324,325, 404, 405, 406, 407, 408 или 409. В конкретном варианте осуществления изобретения предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 404.

В другом варианте осуществления изобретения предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 405.

В настоящем изобретении также предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 404.

В настоящем изобретении также предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 405.

В изобретении также предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) последовательности SEQ ID NO: 75 и вариабельную область легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 74. SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 74, представляют собой род аминокислотных последовательностей VH и VL, охватывающих варианты, демонстрирующие улучшенную термостабильность по сравнению с родительским антителом hu11B6. Сконструированные положения, которые обеспечивают улучшенную термостабильность, представляли собой остатки P41, I49, M70 и A88 в VH (нумерация остатков в соответствии с hu11B6_VH SEQ ID NO: 5) и S80, L82, A88 и Y91 в VL (нумерация остатков в соответствии с hu11B6_VL SEQ ID NO: 2).

SEQ ID NO: 75 (консенсусная последовательность VH)

QVQLQESGPGLVKPSX_1TLSLTCX_2VSGNSITSDYAWNWIRQX_3PGKX_4LEWX_5GYISYSGSTT

YNPSLKSRVTX_6SRDTSKNQFSLKLSSVTX_7X_8DTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 74 (консенсусная последовательность VL)

X_1IVLTQSPX_2X_3LX_4X_5SX_6GERATX_7X_8CX_9ASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPX_{10}LLIYAASNX_{11}

ESGX_{12}PX_{13}RFSGSGSGTDFTLTIX_{14}S$X_{15}X_{16}$QX_{17}EDX$_{18}X_{19}$VYX$_{20}$CQQTRKVPYTFGX_{21}GTKX_{22}EIK

В настоящем изобретении предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит VH SEQ ID NO: 4, 5, 6, 139, 159 или 161 и VL SEQ ID NO: 1, 2, 3, 140 или 160, при условии, что антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, не содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 2.

В настоящем изобретении также предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит

VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140; или
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 160.

В настоящем изобретении также предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 135, 136, 318, 319, 320, 321, 322 или 323.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который

связывает hK2, представляет собой $(scFv)_2$.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит:

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой Fab:

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой $F(ab')_2$.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой Fd:

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой dAb.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой VHH.

В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой Fab.

scFv, связывающие hK2

Любой из доменов VH и VL, идентифицированных в настоящем документе, которые связывают hK2, можно конструировать в формате scFv в ориентации VH-линкер-VL или VL-линкер-VH. Любой из доменов VH и VL, идентифицированных в настоящем документе, также можно использовать для получения $sc(Fv)_2$ структур, таких как VH-линкер-VL-линкер-VL-линкер-VH, VH-линкер-VL-линкер-VH-линкер-VL. VH-линкер-VH-линкер-VL-линкер-VL. VL-линкер-VH-линкер-VH-линкер-VL. VL-линкер-VH-линкер-VL-линкер-VH или VL-линкер-VL-линкер-VH-линкер-VH.

Домены VH и VL, идентифицированные в настоящем документе, могут быть включены в формат scFv, а связывание и термостабильность полученного scFv в отношении hK2 можно оценить с использованием известных способов. Связывание можно оценить с использованием оборудования ProteOn XPR36, BIAcore 3000 или KinExA, ИФА или анализов конкурентного связывания, известных специалистам в данной области. Связывание можно оценить с использованием очищенных супернатантов scFv или E. coli или лизированных клеток, содержащих экспрессированный scFv. Измеренное значение аффинности исследуемого scFv к hK2 может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярности, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например, K_D, K_{on}, K_{off}), как правило, проводятся в стандартизированных условиях и с использованием стандартизированных буферов. Термостабильность можно оценить путем нагревания исследуемого scFv при повышенных температурах, например, при 50°C, 55°C или 60°C в течение периода времени, например, 5 минут (мин), 10 мин, 15 мин, 20 мин, 25 мин или 30 мин, и измерения связывания исследуемого scFv к hK2. ScFv, сохраняющие сопоставимое связывание с hK2 по сравнению с образцом ненагретого scFv, называют термостабильными.

В рекомбинантных системах экспрессии линкер представляет собой пептидный

линкер и может включать любую природную аминокислоту. Иллюстративные аминокислоты, которые могут быть включены в линкер, представляют собой Gly, Ser Pro, Thr, Glu, Lys, Arg, Ile, Leu, His и The. Линкер должен иметь длину, достаточную для связывания VH и VL таким образом, чтобы они формировали правильную конформацию относительно друг друга, чтобы они сохраняли желаемую активность, такую как связывание с hK2.

Линкер может иметь длину около 5-50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину около 10-40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину около 10-35 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину около 10-30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину около 10-25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину около 10-20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину около 15-20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 7 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 8 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 9 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 11 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 12 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 14 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 16 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 17 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 18 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 19 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 21 аминокислота. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 22 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 23 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 24 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 26 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 27 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 28 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 29 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 31 аминокислота. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 32 аминокислоты. В некоторых вариантах

осуществления линкер имеет длину 33 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 34 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 35 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 36 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 37 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 38 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 39 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 40 аминокислот. Иллюстративные линкеры, которые можно использовать, представляют собой богатые Gly линкеры, содержащие Gly и Ser, Gly и Ala линкеры, содержащие Ala и Ser линкеры и другие гибкие линкеры.

Другие последовательности линкеров могут включать участки шарнирной области иммуноглобулина CL или CH1, полученные из тяжелой или легкой цепей иммуноглобулина любого изотипа. В альтернативном варианте различные небелковые полимеры, включая полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль, полиоксиалкилены или сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, могут найти применение в качестве линкеров. Иллюстративные линкеры, которые можно использовать, приведены в **таблице 1**. Дополнительные линкеры описаны, например, в межд. публ. пат. №WO2019/060695.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит, от N-конца к C-концу, VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL).

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит, от N-конца к C-концу, VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108.

Таблица 1.

Название линкера	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Линкер 1	GGSEGKSSGSGSESKSTGGS	7
Линкер 2	GGGSGGGS	76
Линкер 3	GGGSGGGSGGGS	77
Линкер 4	GGGSGGGSGGGSGGGS	78
Линкер 5	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS	79
Линкер 6	GGGGSGGGGSGGGGS	80
Линкер 7	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	81
Линкер 8	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	82
Линкер 9	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	83
Линкер 10	IRPRAIGGSKPRVA	84
Линкер 11	GKGGSGKGGSGKGGS	85
Линкер 12	GGKGSGGKGSGGKGS	86
Линкер 13	GGGKSGGGKSGGGKS	87
Линкер 14	GKGKSGKGKSGKGKS	88
Линкер 15	GGGKSGGKGSGKGGS	89
Линкер 16	GKPGSGKPGSGKPGS	90
Линкер 17	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	91
Линкер 18	GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS	92
Линкер 19	STAGDTHLGGEDFD	93
Линкер 20	GEGGSGEGGSGEGGS	94
Линкер 21	GGEGSGGEGSGGEGS	95
Линкер 22	GEGESGEGESGEGES	96
Линкер 23	GGGESGGEGSGEGGS	97
Линкер 24	GEGESGEGESGEGESGEGES	98

Линкер 25	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	99
Линкер 26	PRGASKSGSASQTGSAPGS	100
Линкер 27	GTAAAGAGAAGGAAAGAAG	101
Линкер 28	GTSGSSGSGSGGSGSGGGG	102
Линкер 29	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	103
Линкер 30	GSGS	104
Линкер 31	APAPAPAPAP	105
Линкер 32	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP	106
Линкер 33	AEAAAKEAAAKEAAAAKEAAAAKEAAAAKAAA	107
Линкер 34	GTEGKSSGSGSESKST	108

В конкретных вариантах осуществления L1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 137 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 138; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 162 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 164 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 165; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 166 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 167; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 168 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 169; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 204 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 205; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 139 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69, и 71, соответственно;

SEQ ID NO: 63, 65, 66, 68, 70, и 71, соответственно;

SEQ ID NO: 72, 73, 66, 67, 69, и 71, соответственно;

SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно.

SEQ ID NO: 170 183, 184, 185, 186, 37 и 187, соответственно;

SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192, и 193, соответственно;

SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, и 209, соответственно;

SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174, и 175, соответственно;

SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 180, и 181, соответственно;

SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186, и 187, соответственно;

SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192, и 193, соответственно; или

SEQ ID NO: 216, 217, 218, 182, 470 и 209, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186 и 187, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 182, 470 и 209, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 180, и 181, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186 и 187, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192 и 193, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 216, 217, 218, 182, 470 и 209, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 68, 70 и 71, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3,

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 72, 73, 66, 67, 69 и 71, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 137, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 138.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 164, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 165.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 166, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%,

по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 167.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 168, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 169.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 204, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 159 и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 161, и VL, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 139, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 159 и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH, которая по меньшей

мере на 95% идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH, которая по крайней мере на 99% идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH, которая по крайней мере на 99% идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 99% идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH, которая по меньшей мере на 95% идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 99% идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, 134, 308, 316, 324 325, 404, 405, 406, 407, 408 или 409.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 133, 134, 308, 316, 324 325, 404, 405, 406, 407, 408 или 409.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 404.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 405.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 75 и VL SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH SEQ ID NO: 4, 5 или 6 и VL SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH SEQ ID NO: 4, 5, 6, 139, 159 или 161 и VL SEQ ID NO: 1, 2, 3, 140 или 160, при условии, что антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, не содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 318.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 319.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 320.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 321.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 322.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 323.

Другие антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2

Любой из доменов VH и VL, идентифицированных в настоящем документе, которые связывают hK2, также могут быть сконструированы в формате Fab, $F(ab')_2$, Fd или Fv, и их связывание с hK2 и термостабильность можно оценить с использованием анализов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 137 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 138; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 162 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163;

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 164 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 165;

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 166 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 167;

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 168 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 169; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 204 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 205.

В конкретном варианте осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 162 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69, и 71, соответственно;

SEQ ID NO: 63, 65, 66, 68, 70, и 71, соответственно;

SEQ ID NO: 72, 73, 66, 67, 69, и 71, соответственно;

SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно;

SEQ ID NO: 170 183, 184, 185, 186, 37 и 187, соответственно;

SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192, и 193, соответственно;

SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, и 209, соответственно;

SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174, и 175, соответственно;

SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 180, и 181, соответственно;

SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186, и 187, соответственно;

SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192, и 193, соответственно; или

SEQ ID NO: 216, 217, 218, 182, 470 и 209, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186, 12 и 187, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470 и 209, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 180, и 181, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186 и 187, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192 и 193, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 216, 217, 218, 182, 470 и 209, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 или 175, соответственно, или SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 75 и VL SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH, которая по меньшей мере на 95% идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH, которая по крайней мере

на 99% идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH, которая по крайней мере на 99% идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 99% идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH, которая по крайней мере на 99% идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 137, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 138.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 164, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 165.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 166, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 167.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 168, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 169.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 204, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 4, 5, 6, 139, 159 или 161 и VL SEQ ID NO: 1, 2, 3, 140 или 160 при условии, что Fab не содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 160.

VH и VL Fab, содержащие антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, можно конструировать в форматах Fab-Fc HC (VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3) и Fab-Fc LC (VL-CL), соответственно. В некоторых таких вариантах осуществления HC Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична SEQ ID NO: 354. В конкретном варианте осуществления HC Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность, которая идентична SEQ ID NO: 354

В некоторых вариантах осуществления HC Fab-Fc содержит C-концевой остаток лизина (например, K477). В некоторых вариантах осуществления HC Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую C-концевой остаток лизина, и последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична SEQ ID NO: 361. В некоторых вариантах осуществления HC Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:361.

В некоторых таких вариантах осуществления HC Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична SEQ ID NO: 221. В конкретном варианте осуществления LC Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность, которая идентична SEQ ID NO: 221

Как показано в примерах, антигенсвязывающий домен, особенно подходящий для включения в мультиспецифический конструкт и связывающий hK2, содержит HC Fab-Fc, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 354, и LC Fab-Fc легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 221.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и

HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 137 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 138; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 162 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163;

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 164 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 165;

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 166 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 167;

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 168 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 169; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 204 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно;

SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186, 37 и 187, соответственно;

SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно;

SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470 и 209, соответственно;

SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 180 и 181, соответственно;

SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186 и 187, соответственно;

SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192 и 193, соответственно; или

SEQ ID NO: 216, 217, 218, 182, 470 и 209, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186, 12 и 187, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470 и 209, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3,

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 180, и 181, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186 и 187, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192 и 193, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 216, 217, 218, 182, 470 и 209, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 75 и VL SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 4, 5, 6, 139, 159 или 161 и VL SEQ ID NO: 1, 2, 3, 140 или 160 при условии, что Fab не содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит

определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 137 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 138; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 162 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163;

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 164 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 165;

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 166 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 167;

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 168 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 169; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 204 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно;

SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186, и 187, соответственно;

SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно;

SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470 и 209, соответственно;

SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 180 и 181, соответственно;

SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186 и 187, соответственно;

SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192 и 193, соответственно; или

SEQ ID NO: 216, 217, 218, 182, 470 и 209, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3,

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186 и 187, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470 и 209, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 180, и 181, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186 и 187, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192 и 193, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 216, 217, 218, 182, 470 и 209, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 75 и VL SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 4, 5 или 6 и VL SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 4, 5, 6, 139, 159 или 161 и VL SEQ ID NO: 1, 2, 3, 140 или 160 при условии, что Fab не содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления Fd содержит VH SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления Fd содержит VH SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления Fd содержит VH SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления Fd содержит VH SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к hK2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC SEQ ID NO: 210 и LC SEQ ID NO: 221.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к hK2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC SEQ ID NO: 211 и LC SEQ ID NO: 222.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к hK2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC SEQ ID NO: 212 и LC SEQ ID NO: 223.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к hK2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC SEQ ID NO: 213 и LC SEQ ID NO: 224.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к hK2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC SEQ ID NO: 219 и LC SEQ ID NO: 220.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к hK2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична SEQ ID NO: 354 и LC, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична SEQ ID NO: 221.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к hK2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична SEQ ID NO: 354 и LC SEQ ID NO: 221.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к hK2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC SEQ ID NO: 354 и LC, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична SEQ ID NO: 221.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к hK2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 354, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 221.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к hK2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC, которая по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 354, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 221.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к hK2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC, которая по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 354, и VL, которая по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 221.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к hK2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 354, и VL, которая по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 221.

В конкретном варианте осуществления выделенное антитело к hK2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC SEQ ID NO: 354 и LC SEQ ID NO: 221

Гомологичные антигенсвязывающие домены и антигенсвязывающие домены с консервативными заменами

Варианты антигенсвязывающих доменов, которые связываю hK2, входят в объем настоящего изобретения. Например, варианты могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29 аминокислотных замен в антигенсвязывающем домене, который связывает hK2, VH и/или VL при условии, что варианты сохранят или будут иметь улучшенные свойства по сравнению с исходными антигенсвязывающими доменами. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей может составлять около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от антигенсвязывающих доменов, которые связываются с hK2 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления вариация находится в каркасных областях. В некоторых вариантах осуществления варианты формируются путем консервативных замен.

Например, антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2, могут содержать замены в положениях остатков D16, A23, P41, G45, I49, M70, A88 и V89 в VH (нумерация остатков в соответствии с hu11B6_VH SEQ ID NO: 5) и положениях остатков D1, D9, S10, A12, V13, L15, I21, N22, K24, K49, R58, V62, D64, S80, L82, Q83, A84, V87, A88, Y91, Q104 и L108 в VL (нумерация остатков в соответствии с hu11B6_VL SEQ ID

NO: 2). Консервативные замены можно проводить в любом указанном положении, а полученные варианты антигенсвязывающих доменов, которые связывают hK2, исследуют на требуемые характеристики с помощью анализов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH и VL, которые по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентичны VH и VL, соответственно, антигенсвязывающего домена, который связывает hK2, описанного в настоящем документе.

Также предложены антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2, содержащие VH и VL, которые по меньшей мере на 80% идентичны

VH с SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163;
VH с SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165;
VH с SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167;
VH с SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169; или
VH с SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 85%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 90%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 91%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 91%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 92%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 93%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 94%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 94%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 95%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 96%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 97%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 98%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 99%.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 137, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 138.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 164, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 165.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 166, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 167.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 166, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 444.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 168, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 169.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2, содержат VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 204, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,*

по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по крайней мере на 85% идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 90% идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 91% идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 92% идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 93% идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 94% идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 95% идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 96% идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 97% идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 98% идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 99% идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 85% идентична VL SEQ ID NO: 163

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 90%

идентична VL SEQ ID NO: 163

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 91% идентична VL SEQ ID NO: 163

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 92% идентична VL SEQ ID NO: 163

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 93% идентична VL SEQ ID NO: 163

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 94% идентична VL SEQ ID NO: 163

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична VL SEQ ID NO: 163

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 96% идентична VL SEQ ID NO: 163

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 97% идентична VL SEQ ID NO: 163

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 98% идентична VL SEQ ID NO: 163

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 99% идентична VL SEQ ID NO: 163

Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от числа идентичных положений, общих для последовательностей (т. е. % идентичности=число идентичных положений/общее число положений × 100), с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, который необходимо встроить для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Процент идентичности между двумя аминокислотным последовательностями можно определить с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller (Comput Appl Biosci 4:11-17 (1988)), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицы массы остатков PAM120, штрафа на длину гэпа 12 и штрафа гэпа 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот можно определить с помощью алгоритма Needleman and Wunsch (J Mol Biol 48:444-453 (1970)), который встроен в программу GAP

в пакете программ GCG (доступен на сайте http_//_www_gcg_com), используя либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, а также веса гэпов 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины гэпов 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В некоторых вариантах осуществления вариантные антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2, содержат одну или две консервативные замены в любой из областей CDR, сохраняя при этом желаемые функциональные свойства исходных антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают hK2.

Термин «**консервативные модификации**» означает модификации аминокислот, которые незначительно изменяют или влияют на характеристики связывания антитела, содержащего такие модификации аминокислот. Консервативные модификации включают замены, добавления и делеции аминокислот. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, в которых аминокислота заменена аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Классы аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи, четко определены и включают аминокислоты с кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин, триптофан), ароматическими боковыми цепями (например, фенилаланин, триптофан, гистидин, тирозин), алифатическими боковыми цепями (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), амидами (например, аспарагин, глутамин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и серосодержащими боковыми цепями (цистеин, метионин). Дополнительно любой нативный остаток в полипептиде может быть замещен аланином, согласно способу, описанному ранее как аланин-сканирующий мутагенез (MacLennan et al., (1988) Acta Physiol Scand Suppl 643:55-67; Sasaki et al., (1988) Adv Biophys 35:1-24). Аминокислотные замены в антителах по изобретению могут быть выполнены известными способами, например методом ПЦР-опосредованного мутагенеза (патент США № 4,683,195). Альтернативно библиотеки вариантов можно создавать, например, путем применения случайных (NNK) или неслучайных кодонов, например кодонов DVK, кодирующих 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp). Характеристики полученных вариантов могут быть исследованы с использованием анализов, описанных в настоящем документе.

Способы получения антигенсвязывающего фрагмента, связывающего hK2

Антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2, предложенные в настоящем изобретении, можно получить с использованием различных технологий. Например, для идентификации пар VH/VL, которые связывают hK2, можно применять метод гибридом по Колеру и Мильштейну. В методе гибридом мышь или другое животное-хозяина, например хомяка, крысу или курицу, иммунизируют hK2 человека и/или яванского макака с последующим слиянием спленоцитов от иммунизированных

животных с клетками миеломы с использованием стандартных способов с образованием клеток гибридомы. Колонии, возникающие из одиночных клеток иммортализованной гибридомы, можно подвергнуть скринингу на продукцию антител, содержащих антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2, с желательными свойствами, такими как специфичность связывания, перекрестная реактивность или ее отсутствие, аффинность к антигену и желаемая функциональность.

Антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2 и которые получают путем иммунизации животных, отличных от человека, могут быть гуманизированы. Примеры методик гуманизации, включающих в себя отбор человеческих акцепторных каркасов, включают в себя прививание CDR (патент США № 5,225,539), прививание SDR (патент США № 6,818,749), изменение поверхности (Padlan, (1991) Mol Immunol 28:489-499), изменение поверхности определяющих специфичность остатков (патентная публикация США № 2010/0261620), адаптацию человеческого каркаса (патент США № 8,748,356) или супергуманизацию (патент США № 7,709, 226). В этих способах CDR или часть остатков CDR исходных антител переносят на человеческие каркасы, которые можно выбирать на основании их общей гомологии с исходными каркасами, на основании сходства длины CDR или идентичности канонической структуры либо их комбинации.

Гуманизированные антигенсвязывающие домены могут быть дополнительно оптимизированы для улучшения их селективности или аффинности к требуемому антигену посредством включения измененных остатков, поддерживающих каркас, с сохранением аффинности связывания (обратных мутаций) такими методиками, которые описаны в международных патентных публикациях № WO1090/007861 и WO1992/22653, или посредством встраивания вариации в любую из CDR, например, для улучшения аффинности антигенсвязывающего домена.

Для получения антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают hK2, можно применять трансгенных животных, несущих в своем геноме локусы иммуноглобулинов (Ig) человека, таких как мыши, крысы или куры, которые описаны, например, в патенте США № 6,150,584, международной патентной публикации № WO1999/45962, международных патентных публикациях №№ WO2002/066630, WO2002/43478, WO2002/043478 и WO1990/04036. Эндогенные локусы иммуноглобулинов у таких животных можно разрывать или удалять, и в геном животного можно встраивать по меньшей мере один полный или частичный локус иммуноглобулина человека посредством гомологичной или негомологичной рекомбинации, с применением трансхромосом или с применением минигенов. Для получения человеческих антител, направленных против выбранного антигена, с применением описанной выше технологии можно обратиться к таким компаниям, как Regeneron (http://_www_regeneron_com), Harbour Antibodies (http://_www_harbourantibodies_com), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (http://_www_omtinc_net), KyMab (http://_www_kymab_com), Trianni (http://_www.trianni_com) и Ablexis (http://_www_ablexis_com). В некоторых вариантах осуществления мышей линии Abblexis и крыс линии OmniRats иммунизировали

растворимым полноразмерным белком KLK2 (человеческий калликреин-2 6-His белок) (SEQ ID NO: 454).

Антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2, можно выбирать из библиотеки фагового дисплея, причем фаг выработан с возможностью экспрессии человеческих иммуноглобулинов или их частей, таких как Fab, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные либо спаренные вариабельные области антител. Антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2, могут быть выделены, например, из библиотеки фагового дисплея, экспрессирующей вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела в виде гибридных белков с белком оболочки бактериофага pIX, как описано в публикации Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385-96 и в международной патентной публикации № WO09/085462). В библиотеках можно проводить скрининг на связывание фагов с hK2 человека и/или яванского макака, и полученные положительные клоны могут быть дополнительно охарактеризованы, и из лизатов клонов могут быть выделены Fab или конвертированы в scFvs или другие конфигурации антигенсвязывающих фрагментов.

Получение иммуногенных антигенов и экспрессия и продукция антигенсвязывающих доменов по изобретению могут быть выполнены с применением любой приемлемой методики, такой как продукция рекомбинантного белка. Иммуногенные антигены можно вводить животным в форме очищенного белка или белковых смесей, включающих в себя целые клетки или клеточные либо тканевые экстракты, или антиген может быть образован de novo в организме животного из нуклеиновых кислот, кодирующих указанный антиген или его часть.

Конъюгация с фрагментами, продлевающими период полужизни

Антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2 согласно настоящему изобретению, могут быть конъюгированы с фрагментом, продлевающим период полужизни. Примеры фрагментов, продлевающих период полужизни, представляют собой альбумин, варианты альбумина, альбумин-связывающие белки и/или домены, трансферрин и их фрагменты и аналоги, иммуноглобулины (Ig) или их фрагменты, такие как Fc-области. Известны аминокислотные последовательности вышеупомянутых фрагментов, продлевающих период полужизни. Ig или их фрагменты включают все изотипы, *m. e.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA и IgE.

Дополнительные фрагменты, продлевающие период полужизни, которые могут быть конъюгированы с антигенсвязывающими доменами, которые связывают hK2 по изобретению, включают молекулы полиэтиленгликоля (PEG), такие как PEG5000 или PEG20000, жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот с различной длиной цепи, например лаурат, миристат, стеарат, арахидат, бегенат, олеат, арахидонат, октандикарбоновая кислота, тетрадекандикарбоновая кислота, октадекандикарбоновая кислота, докозандикарбоновая кислота и т. п., полилизин, октан, углеводы (декстран, целлюлоза, олиго- или полисахариды) для получения желаемых свойств. Эти фрагменты могут представлять собой результаты прямого слияния с антигенсвязывающими

доменами, которые связываются с hK2 по изобретению, и их можно создавать стандартными методиками клонирования и экспрессии. В альтернативном варианте осуществления для присоединения фрагментов к полученным путем рекомбинации антигенсвязывающим доменам, которые связывают hK2 по изобретению, можно использовать хорошо известные способы химического связывания.

Пегильный фрагмент может быть, например, конъюгирован с антигенсвязывающим доменом, который связывает hK2 по изобретению, путем включения цистеина в С-конец антигенсвязывающего домена, который связывает hK2 по изобретению, или конструирования цистеинов в положения остатков, которые обращены в противоположную сторону от сайта связывания hK2 и прикрепления пегильной группы к цистеину с использованием хорошо известных способов.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент, который связывает hK2, конъюгирован с фрагментом, продлевающим период полужизни.

Согласно некоторым вариантам осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой иммуноглобулин (Ig), фрагмент Ig, константную область Ig, фрагмент константной области Ig, Fc-область, трансферрин, альбумин, альбумин-связывающий домен или полиэтиленгликоль. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой константную область Ig.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой Ig.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой фрагмент Ig.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой константную область Ig.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой фрагмент константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой Fc-область.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой альбумин.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой альбумин-связывающий домен.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой трансферин.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой полиэтиленгликоль.

Фармакологические свойства атигенсвязывающих доменов, которые связывают hK2, конъюгированных с фрагментом, продлевающим период полужизни, можно оценить с использованием in vivo моделей.

Конъюгация с константными областями иммуноглобулина (Ig) или фрагментами

константных областей Ig

Антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2 по изобретению, могут быть конъюгированы с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig для придания антителоподобных свойств, включая эффекторные функции Fc, связывание комплемента C1q, комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание рецептора Fc, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз или подавление регуляции рецепторов клеточной поверхности (например, рецептор B-клеток; BCR). Функции константной области Ig или фрагмента константной области Ig также могут быть использованы в качестве фрагмента, продлевающего период полужизни, как описано в настоящем документе. Антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2 по изобретению, могут быть сконструированы как стандартные полноразмерные антитела с использованием стандартных способов. Полноразмерные антитела, содержащие антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, можно дополнительно конструировать, как описано в настоящем документе.

Константная область тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из субдоменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3. Домен CH1 охватывает остатки A118-V215, остатки доменов CH2 A231-K340 и остатки доменов CH3 G341-K447 на тяжелой цепи, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC. В некоторых случаях G341 называют остатком домена CH2. Шарнирная область по существу определяется как область человеческого IgG1, включающая E216 и заканчивающаяся на P230. Fc-область Ig содержит по меньшей мере домены CH2 и CH3 константной области Ig и, следовательно, содержит по меньшей мере область от около A231 до K447 константной области тяжелой цепи Ig.

В изобретении также предложен антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 и который конъюгирован с константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig представляет собой константную область тяжелой цепи

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig представляет собой константную область легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит Fc-область.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH2.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH3.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнирной области, домен CH2 и домен CH3. Часть шарнирной

области относится к одному или более аминокислотным остаткам шарнирной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит шарнирную область, домен CH2 и домен CH3.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с N-концом константной области Ig или фрагментом константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с C-концом константной области Ig или фрагментом константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig посредством второго линкера (L2).

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 или 108.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 107.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108.

Функциональные возможности антигенсвязывающих доменов, которые связывают hK2 по изобретению и которые конъюгированы с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, можно оценить с использованием нескольких известных анализов. Связывание с hK2 можно оценить с использованием способов, описанных в настоящем документе. Измененные свойства, которые были переданы константным доменом Ig или фрагментом константной области Ig, таким как Fc-область, можно оценить в анализах связывания рецептора Fc с использованием растворимых форм рецепторов, таких как FcγRI, FcγRII, FcγRIII или FcRn, или с использованием клеточных анализов, измеряющих, например, ADCC, CDC или ADCP.

ADCC можно оценить с помощью анализа in vitro с использованием клеток, экспрессирующих hK2, в качестве клеток-мишеней и NK-клеток в качестве эффекторных клеток. Цитолиз можно обнаруживать по высвобождению метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или природных внутриклеточных белков) из лизированных клеток. В примере анализа клетки-мишени применяли в соотношении 1 клетка-мишень на 4 эффекторные клетки. Клетки-мишени предварительно маркируют BATDA и объединяют с эффекторными клетками и исследуемым антителом. Пробы инкубируют в течение 2 часов и измеряют лизис клеток путем измерения высвобождения BATDA в супернатант. Данные нормализуют по максимальной цитотоксичности с 0,67% Triton X-100 (Sigma Aldrich) и минимальному контролю, который определяют по высвобождению BATDA из клеток-мишеней в отсутствие любого антитела.

ADCP можно оценить с использованием макрофагов, полученных из моноцитов, в качестве эффекторных клеток и любых клеток, экспрессирующих hK2, в качестве клеток-мишеней, которые конструированы для экспрессии GFP или другой меченой молекулы. В примере анализа соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней может составлять, например, 4 : 1. Эффекторные клетки можно инкубировать с клетками-мишенями в течение 4 часов с антителом по изобретению или без него. После инкубации клетки можно отделять с помощью аккутазы. Идентификацию макрофагов можно проводить с помощью антител к CD11b и к CD14, связанных с флуоресцентной меткой, а процентное значение фагоцитоза можно определять на основании % флуоресцентного GFP в макрофагах $CD11^{+}CD14^{+}$ с помощью стандартных способов.

CDC для клеток можно измерять, например, посредством высевания клеток Дауди в количестве 1×10^5 клеток/лунка (50 мкл/лунка) в RPMI-B (RPMI с добавлением 1% BSA), добавления 50 мкл исследуемого белка в лунки до конечной концентрации в диапазоне 0-100 мкг/мл, инкубирования реакционной смеси в течение 15 мин при комнатной температуре, добавления 11 мкл объединенной человеческой сыворотки в лунки и инкубирования реакционной смеси в течение 45 мин при 37 °C. Процентное

значение (%) лизированных клеток можно определять как % окрашенных пропидий йодидом клеток в анализе FACS с помощью стандартных способов.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с константной областью тяжелой цепи IgG1 или фрагментом константной области тяжелой цепи IgG1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с константной областью тяжелой цепи IgG1 или фрагментом константной области тяжелой цепи IgG1 (*например,* включающим шарнирную область-CH2-CH3), содержащим аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична SEQ ID NO: 110. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи IgG1 содержит молчащую мутацию Fc (L234A_L235A_D265S) и мутации T350 V_T366L_K392L_T394W, сконструированные так, чтобы обеспечить активацию селективной гетеродимеризации. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с константной областью тяжелой цепи IgG1 или фрагментом константной области тяжелой цепи IgG1, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с константной областью тяжелой цепи IgG1 (*например,* с шарнирной областью-CH2-CH3), содержащей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична SEQ ID NO: 378. В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с константной областью тяжелой цепи IgG1 или фрагментом константной области тяжелой цепи IgG1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 378.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с константной областью легкой цепи IgG1, содержащей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична SEQ ID NO: 309. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с константной областью легкой цепи IgG1, содержащей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична SEQ ID NO: 447. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с константной областью легкой цепи IgG1, содержащей аминокислотную последовательность, которая идентична SEQ ID NO: 309 или 447. В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает

hK2, конъюгирован с константной областью легкой цепи IgG1, содержащей аминокислотную последовательность, которая идентична SEQ ID NO: 309.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 и который конъюгирован с константной областью тяжелой цепи IgG1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 378, и антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с константной областью легкой цепи IgG1, содержащей аминокислотную последовательность, которая идентична SEQ ID NO: 309.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 и первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, и первый константный участок легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 и (i) первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378; и (ii) первую константную область легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например,* CD3) и вторую константную область Ig или фрагмент второй константной области Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 109.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 и (i) первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378; и (ii) первую константную область легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309, и при этом выделенный белок дополнительно содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном (*например,* CD3) и вторую константную область Ig или фрагмент второй константной области Ig, содержащие аминокислотную

последовательность, идентичную SEQ ID NO: 109.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, и первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, и первый константный участок легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, и (ii) первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378; и (ii) первую константную область легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например,* CD3), причем второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261, и вторую константную область Ig или фрагмент второй константной области Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 109.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, и (ii) первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378; и (ii) первую константную область легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая

содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309, и при этом выделенный белок дополнительно содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например,* CD3), причем второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261, и вторую константную область Ig или фрагмент второй константной области Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 109.

В конкретном варианте осуществления изобретения выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, и первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378.

В конкретном варианте осуществления изобретения выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, и первую константную область легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309.

В конкретном варианте осуществления изобретения выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, и (i) первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378; и (ii) первую константную область легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например,* CD3), причем второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 331 и вторую константную область Ig или фрагмент второй константной области Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 109.

В конкретном варианте осуществления изобретения выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, и (i) первую константную область

тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378; и (ii) первую константную область легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309, и при этом выделенный белок дополнительно содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном (*например,* CD3), причем второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 331 и вторую константную область Ig или фрагмент второй константной области Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 109.

Белки, содержащие антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2 по изобретению

Антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2 по изобретению, могут быть сконструированы как моноспецифические или мультиспецифические белки различных конфигураций использованием стандартных способов.

В настоящем изобретении также предложен моноспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления моноспецифический белок представляет собой антитело.

В настоящем изобретении также предложен мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок является биспецифическим.

В некоторых вариантах осуществления мультимерный белок является биспецифическим.

В некоторых вариантах осуществления мультимерный белок является тетраспецифическим.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок является одновалентным для связывания с hK2.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок является бивалентным для связывания с hK2.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (такой как CD3).

В некоторых вариантах осуществления лимфоцитарный антиген представляет собой Т-клеточный антиген.

В некоторых вариантах осуществления Т-клеточный антиген представляет собой $CD8^+$ антиген Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления лимфоцитарный антиген представляет

собой антиген NK-клеток.

В некоторых вариантах осуществления лимфоцитарный антиген представляет собой CD3, CD3 эпсилон (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195 или NKG2C.

В некоторых вариантах осуществления лимфоцитарный антиген представляет собой CD3ε.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В некоторых вариантах осуществления белок антитела к hK2/антитела CD3 является биспецифическим.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит Fab.

В конкретных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит Fab.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит Fab.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит $F(ab')_2$.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит $F(ab')_2$.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит $F(ab')_2$.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VHH.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VHH.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VHH.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит Fv.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит Fv.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен,

который связывает лимфоцитарный антиген, содержит Fv.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержат Fd.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит Fd.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит Fd.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv.

В конкретном варианте осуществления мультиспецифический белок является биспецифическим, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит Fab и второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (например, CD3) содержит scFv.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает, содержит scFv.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит Fab.

В конкретных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит Fab, а второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv, а второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит Fab'.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит Fab' и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит Fv.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит dAb, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит dAb.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит Fd и второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VHH.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VHH и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит Fv и второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит Fd.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит, от N-конца к C-концу, VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит около 5-50 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит около 5-40 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит около 10-30 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит около 10-20 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 или 108.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108.

В конкретных вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 72, 141, 147, 170, 176, 188, 200, 206 или 216, HCDR2 SEQ ID NO: 177, 188, 189, 195, 197, 199, 201, 207 или 217, HCDR3 SEQ ID NO: 66, 143, 172, 178, 184, 190, 208 или 218, LCDR1 SEQ ID NO: 67, 68, 144, 173, 179, 182, 185 или 191, LCDR2 SEQ ID NO: 69, 70, 145, 174, 180, 186, 192 или 470, и LCDR3 SEQ ID NO: 71, 146, 175, 181, 187, 193 или 209.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

SEQ ID NO: 63, 65, 66, 68, 70 и 71, соответственно;

SEQ ID NO: 63, 64, 66, 67, 69 и 71, соответственно;

SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно;

SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно;

SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186 и 187, соответственно;

SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно;

SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470 и 209, соответственно;

SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

SEQ ID NO: 72, 73, 66, 68, 70 и 71, соответственно;

SEQ ID NO: 72, 73, 66, 67, 69 и 71, соответственно;

SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 190 и 181, соответственно;

SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186 и 187, соответственно;

SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192 и 193, соответственно; или

SEQ ID NO: 216, 217, 218, 182, 470 и 209, соответственно.

В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий домен,

который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 или 175, соответственно, или SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, необязательно представляет собой CD3, эпсилон CD3 (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195 или NKG2C, такой как CD3.

В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, необязательно представляет собой CD3, эпсилон CD3 (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195 или NKG2C, такой как CD3.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 75 и VL SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 75 и VL SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей

мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 163, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, необязательно представляет собой CD3, эпсилон CD3 (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195 или NKG2C, такой как CD3.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, необязательно представляет собой CD3, эпсилон CD3 (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195 или NKG2C, такой как CD3.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 163, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, необязательно представляет собой CD3, эпсилон CD3 (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195 или NKG2C, такой как CD3.

В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В конкретном варианте осуществления изобретения первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, необязательно представляет собой CD3, эпсилон CD3 (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195 или NKG2C, такой как CD3.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 4, 5, 6, 139, 159 или 161 и VL SEQ ID NO: 1, 2, 3, 140 или 160 при условии, что Fab не содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен,

который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 4, 5 или 6 и VL SEQ ID NO: 1, 2 или 3, при условии, что антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, не содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит:

VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140; или
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 133, 134, 135, 136, 308, 316, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 404, 405, 406, 407, 408 или 409.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 308.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 316.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 318.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 319.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 320.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 321.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 322.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 323.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 324.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 325.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 404.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 405.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 406.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 407.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 408.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 409.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 404.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 405.

В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 404 или 405. В настоящем изобретении предложен второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 248 и вариабельную область легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 157. SEQ ID NO: 248 и S1EQ ID NO: 157 представляет собой аминокислотные последовательности VH и VL исходного антитела CD3B815.

Консенсусная последовательность VL (SEQ ID NO: 157)

$DIQX_1TQSPX_2X_3LSX_4SX_5GX_6RVX_7X_8X_9CRARQSIGTAIHWYQQKX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}PX_{14}LLIX_{15}YASESISGX_{16}PSRFSGSGSGTDFTLTIX_{17}SX_{18}QX_{19}EDX_{20}AX_{21}YYCQQSX_{22}SWPYTFGX_{23}GTKLEIK$

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит:

HCDR1 с SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259, и LCDR3 SEQ ID NO: 260; или

HCDR1 с SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит:

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 249; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 250; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 252; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 253; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 254.

В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 248, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 251.

В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251.

В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 251.

В конкретном варианте осуществления второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 116, HCDR2 SEQ ID NO: 117, HCDR3 SEQ ID NO: 118, LCDR1 SEQ ID NO: 119, LCDR2 SEQ ID NO: 120 и LCDR3 SEQ ID NO: 121; или

VH с SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123.

В конкретном варианте осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261.

В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261

В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261.

В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251.

В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251.

В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261.

В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй

антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 275, 258, 259 и 261, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

причем первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186 и 187, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, 209, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, 209, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259, и 261, соответственно; или

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 275, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67,

69 и 71, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок

представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186 и 187, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, 209, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2,

содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, 209, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В настоящем изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:139 и VL SEQ ID NO:140, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:139 и VL SEQ ID NO:140, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO:123;

причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:137 и VL SEQ ID NO:138, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:137 и VL SEQ ID NO:138, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO:123;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:168 и VL SEQ ID NO:169, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:162 и VL SEQ ID NO:163, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:166 и VL SEQ ID NO:444, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID

NO:164 и VL SEQ ID NO:165, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:168 и VL SEQ ID NO:169, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO:123;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:204 и VL SEQ ID NO:205, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO:123;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:204 и VL SEQ ID NO:205, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251; или

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:162 и VL SEQ ID NO:163, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:139 и VL SEQ ID NO:140, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:139 и VL SEQ ID NO:140, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO:123.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:137 и VL SEQ ID NO:138, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:137 и VL SEQ ID NO:138, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO:123.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:168 и VL SEQ ID NO:169, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:162 и VL SEQ ID NO:163, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:166 и VL SEQ ID NO:444, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:164 и VL SEQ ID NO:165, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:168 и VL SEQ ID NO:169, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO:123.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:204 и VL SEQ ID NO:205, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO:123.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:204 и VL SEQ ID NO:205, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:162 и VL SEQ ID NO:163, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO:251.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с первой константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом первой константной области Ig, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, конъюгирован со второй константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом второй константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент первой константной области Ig и/или фрагмент второй константной области Ig содержит Fc-область.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент первой константной области Ig

и/или фрагмент второй константной области Ig содержит домен CH2.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент первой константной области Ig и/или фрагмент второй константной области Ig содержит домен CH3.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент первой константной области Ig и/или фрагмент второй константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент первой константной области Ig и/или фрагмент второй константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнирной области, домен CH2 и домен CH3.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит шарнирную область, домен CH2 и домен CH3.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок дополнительно содержит второй линкер (L2) между первым антигенсвязывающим доменом, который связывает hK2, и первой константной областью Ig или фрагментом первой константной области Ig, и между вторым антигенсвязывающим доменом, который связывает лимфоцитарный антиген, и второй константной областью Ig или фрагментом второй константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 или 108.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig представляют собой IgG1, IgG2 и IgG3 или изотип IgG4.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig представляют собой изотип IgG1.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig представляют собой изотип IgG2.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig представляют собой изотип IgG3.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig представляют собой изотип IgG4.

В конкретном варианте осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig представляют собой изотип IgG1.

Первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig могут быть дополнительно сконструированы, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению связывания мультиспецифического белка с FcγR.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая приводит к уменьшению связывания мультиспецифического белка с Fc γR, выбрана из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-делеции/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/G236-делеции/G237A/P238S, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC. В конкретном варианте осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и/или вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат следующие мутации: L234A_L235A_D265S.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с Fcγ-рецептором (FcγR).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбирают из группы, состоящей из S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, причем нумерация остатков соответствует индексу EC.

В некоторых вариантах осуществления изобретения FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB or FcγRIII или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая модулирует период полувыведения мультиспецифического белка, выбрана из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, причем нумерация остатков соответствует каталогу EC.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одна мутация в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig выбираются из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, причем нумерация остатков соответствует индексу EU. В конкретном варианте осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig содержит следующие мутации T350 V_T366L_K392L_T394W и/или вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержит следующие мутации T350 V_L351Y_F405A_Y407 V.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат следующие мутации

L234A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W во второй константной области Ig; или

L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V во второй константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат следующие мутации

L234A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V в первой константной области Ig и L234A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W во второй константной области Ig; или

L234A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W в первой константной области Ig и L234A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V во второй константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична SEQ ID NO: 378.

В конкретном варианте осуществления первая константная область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первая константная область

легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична SEQ ID NO: 309.

В конкретном варианте осуществления первая константная область легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309.

В некоторых вариантах осуществления вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична SEQ ID NO: 109.

В конкретном варианте осуществления вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 109.

В конкретном варианте осуществления первая константная область тяжелой цепи Ig содержит аминокислотную последовательность, которая идентична SEQ ID NO: 378, первая константная область легкой цепи Ig содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309, а вторая константная область Ig содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 109.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 и первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, и первый константный участок легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 и (i) первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378; и (ii) первую константную область легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например,* CD3) и вторую константную область Ig или фрагмент

второй константной области Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 109.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 и (i) первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378; и (ii) первую константную область легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309, и при этом выделенный белок дополнительно содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном (*например,* CD3) и вторую константную область Ig или фрагмент второй константной области Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 109.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, и первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, и первый константный участок легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, и (ii) первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378; и (ii) первую константную область легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например,* CD3), причем второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2

SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261, и вторую константную область Ig или фрагмент второй константной области Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 109.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, и (ii) первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378; и (ii) первую константную область легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309, и при этом выделенный белок дополнительно содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например,* CD3), причем второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261, и вторую константную область Ig или фрагмент второй константной области Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 109.

В конкретном варианте осуществления изобретения выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, и первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378.

В конкретном варианте осуществления изобретения выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, и первую константную область легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309.

В конкретном варианте осуществления изобретения выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, и (i) первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378; и (ii) первую константную область легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO:

309.

В конкретном варианте осуществления выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например,* CD3), причем второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 331 и вторую константную область Ig или фрагмент второй константной области Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 109.

В конкретном варианте осуществления изобретения выделенный белок, описанный в настоящем документе, содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, и (i) первую константную область тяжелой цепи Ig или фрагмент первой константной области тяжелой цепи Ig, содержащие аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 378; и (ii) первую константную область легкой цепи Ig или фрагмент первой константной области легкой цепи Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 309, и при этом выделенный белок дополнительно содержит второй антигенсвязывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном (*например,* CD3), причем второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 331 и вторую константную область Ig или фрагмент второй константной области Ig, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 109.

Получение мультиспецифических белков, которые содержат антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают hK2

Антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают hK2 по изобретению, можно конструировать в мультиспецифические антитела, которые также входят в объем настоящего изобретения.

Антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают hK2, можно конструировать в полноразмерные мультиспецифические антитела, которые созданы с помощью обмена Fab-плечами, в которых замены вводят в два моноспецифических двухвалентных антитела в пределах константного участка Ig домена CH3, который способствует обмену Fab-плечами in vitro. В этих способах два моноспецифических бивалентных антитела конструируют так, чтобы они имели определенные замены в домене CH3, способствующие стабильности гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения подверженности цистеинов в шарнирной области изомеризации дисульфидной связи; получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно оптимально возвращать к невосстанавливающим. Примерами восстанавливающих агентов, которые можно использовать, являются 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиоэритрит (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин

(TCEP), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбирают из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20 °C в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-MEA или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при уровне pH 5-8, например при pH=7,0 или при pH=7,4.

Мутации CH3, которые можно использовать, включают в себя такие технологии, как мутации «выступ во впадину» (Genentech), электростатически спариваемые мутации (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), сконструированное посредством обмена цепей доменное тело (SEEDbody) (EMD Serono) и другие асимметричные мутации (например, Zymeworks).

Мутации «выступ во впадину» описаны, например, в WO1996/027011 и включают в себя мутации на границе раздела области CH3, в которой аминокислоту с небольшой боковой цепью (впадина) вводят в первую область CH3, а аминокислоту с большой боковой цепью (выступ) вводят во вторую область CH3, что приводит к предпочтительному взаимодействию между первой областью CH3 и второй областью CH3. Примерами мутаций в области CH3, образующих выступ и впадину, являются T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Образование гетеродимера тяжелой цепи можно стимулировать путем использования электростатических взаимодействий посредством замены положительно заряженных остатков в первой области CH3 и отрицательно заряженных остатков во второй области CH3, как описано в US2010/0015133, US2009/0182127, US2010/028637 или US2011/0123532.

Другими асимметричными мутациями, которые можно применять для стимуляции гетеродимеризации тяжелых цепей, являются L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F, or T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в US2012/0149876 or US2013/0195849 (Zymeworks).

Мутации SEEDbody включают замещение выбранных остатков IgG остатками IgA для стимуляции гетеродимеризации тяжелых цепей, как описано в US20070287170.

Другие примеры мутаций, которые могут быть использованы, представляют собой R409D_K370E/D399K_E357K, S354C_T366W/Y349C_ T366S_L368A_Y407V, Y349C_T366W/S354C_T366S_L368A_Y407V, T366K/L351D, L351K/Y349E, L351K/Y349D, L351K/L368E, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, K392D/D399K, K392D/ E356K, K253E_D282K_K322D/D239K_E240K_K292D, K392D_K409D/D356K_D399K, как описано в WO2007/147901, WO 2011/143545, WO2013157954, WO2013096291 и US2018/0118849.

Мутации Duobody® (Genmab) описаны, например, в US9150663 и US2014/0303356

и включают в себя мутации F405L/K409R, дикого типа/F405L_R409K, T350I_K370T_F405L/K409R, K370W/K409R, D399AFGHILMNRSTVWY/K409R, T366ADEFGHILMQVY/K409R, L368ADEGHNRSTVQ/K409AGRH, D399FHKRQ/K409AGRH, F405IKLSTVW/K409AGRH и Y407LWQ/K409AGRH.

Дополнительные биспецифические или мультиспецифические структуры, в которые могут быть встроены антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2, включают иммуноглобулины с двойным вариабельным доменом (DVD) (международная патентная публикация № WO2009/134776; DVD представляют собой полноразмерные антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую структуру VH1-линкер-VH2-CH, и легкую цепь, имеющую структуру VL1-линкер-VL2-CL; где линкер необязателен), структуры, включающие различные димеризационные домены для соединения двух плеч антител с разной специфичностью, такие как «лейциновая застежка» или коллагеновые димеризационные домены (международная патентная публикация № WO2012/022811, патент США № 5,932,448; патент США № 6,833,441), два или более доменных антитела (dAb), конъюгированных вместе, диатела, антитела, имеющие только тяжелую цепь, такие как антитела верблюжьего типа и сконструированные антитела верблюжьего типа, антитела с двойным нацеливанием (DT)-Ig (GSK/Domantis), антитело «два в одном» (Genentech), поперечно сшитые Mab (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star) и CovX-тело (CovX/Pfizer), IgG-подобные биспецифические антитела (InnClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) и BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) и TvAb (Roche), слитые белки ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (Fc-DART) (MacroGenics) и Dual(ScFv)2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine, Китай), антитела «двойного действия» или Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), двухвалентное биспецифическое антитело (Biotecnol) и Fab-Fv (UCB-Celltech). Антитела на основе ScFv, диател и доменные антитела включают в себя, без ограничений, биспецифический Т-клеточный активатор (BiTE) (Micromet), тандемное диателo (Tandab) (Affimed), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (DART) (MacroGenics), одноцепочечное диателo (Academic), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), слитый белок ScFv и человеческого сывороточного альбумина (Merrimack), COMBODY (Epigen Biotech), нанотела с двойным нацеливанием (Ablynx), доменные антитела с двойным нацеливанием, имеющие только тяжелую цепь.

Антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2 по изобретению, также могут быть конструированы в мультиспецифические белки, которые содержат три полипептидных цепи. В таких конструкциях по меньшей мере один антигенсвязывающий домен находится в форме scFv. Примеры конструкций включают (где «1» обозначает первый антигенсвязывающий домен, «2» обозначает второй антигенсвязывающий домен и «3» обозначает третий антигенсвязывающий домен:

Конструкция 1: Цепь A) scFv 1- CH2-CH3; Цепь B) VL2-CL; Цепь C) VH2-CH1-шарнирная область-CH2-CH3

Конструкция 2: Цепь A) scFv1-шарнирная область-CH2-CH3; Цепь B) VL2-CL; Цепь C) VH2-CH1-шарнирная область-CH2-CH3

Конструкция 3: Цепь A) scFv 1-CH1-шарнирная область-CH2-CH3; Цепь B) VL2-CL; Цепь C) VH2-CH1-шарнирная область-CH2-CH3

Конструкция 4: Цепь A) CH2-CH3-scFv1; Цепь B) VL2-CL; Цепь C) VH2-CH1-шарнирная область-CH2-CH3

Конструирование CH3 может быть встроено в конструкции 1-4, такие как мутации L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W как описано в US2012/0149876 или US2013/0195849 (Zymeworks).

В конкретном варианте осуществления конструкция представляет собой: Цепь A) scFv-шарнирная область-CH2-CH3; Цепь B) VL2-CL; Цепь C) VH2-CH1-шарнирная область-CH2-CH3.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (такой как CD3), причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 63, 72, 141, 147, 170, 176, 188, 194, 196, 198, 200, 206 или 216, HCDR2 SEQ ID NO: 64, 65, 73, 142, 148, 171, 177, 188, 189, 195, 197, 199, 201, 207 или 217, HCDR3 SEQ ID NO: 66, 143, 172, 178, 184, 190, 208 или 218, LCDR1 SEQ ID NO: 67, 68, 144, 173, 179, 182, 185 или 191, LCDR2 SEQ ID NO: 69, 70, 145, 174, 180, 186, 192 или 470 и LCDR3 SEQ ID NO: 71, 146, 175, 181, 187, 193 или 209.

В некоторых вариантах осуществления лимфоцитарный антиген представляет собой CD3. В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (такой как CD3), причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно;

SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186 и 187, соответственно;

SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно;

SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470 и 209, соответственно;

SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 190 и 181, соответственно;

SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186 и 187, соответственно;

SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192 и 193, соответственно; или

SEQ ID NO: 216, 217, 218, 182, 470 и 209, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления лимфоцитарный антиген представляет собой CD3. В конкретном варианте осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например* CD3), причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 или 175, соответственно, или SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (такой как CD3), причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит

VH с SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138;

VH с SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163;

VH с SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165;

VH с SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167;

VH с SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169; или

VH с SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления лимфоцитарный антиген представляет собой CD3.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (такой как CD3), причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 75 и VL SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления лимфоцитарный антиген представляет собой CD3.В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например,* CD3), причем первый антигенсвязывающий домен содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

В конкретных вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например* CD3), причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей

мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

В конкретном варианте осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например* CD3), причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, который по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В конкретном варианте осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например* CD3), причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, который по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

В конкретном варианте осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например* CD3), причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (такой как CD3), причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 4, 5, 6, 137, 139, 159 или 161 и VL SEQ ID NO: 1, 2, 3, 140 или 160, при условии, что антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, не содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления лимфоцитарный антиген представляет собой CD3.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (такой как CD3), причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит:

VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1;

VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2;

VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3;

VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 140;

VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 160;

VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140; или
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления лимфоцитарный антиген представляет собой CD3.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (такой как CD3), причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 133, 134, 135, 136, 308, 316, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 404, 405, 406, 407, 408 или 409.

В некоторых вариантах осуществления лимфоцитарный антиген представляет собой CD3.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например* CD3), причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на

85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 404 или 405.

В конкретном варианте осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген (*например* CD3), причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность VH SEQ ID NO: 404 или 405.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 255 или 116, HCDR2 SEQ ID NO: 256 или 117, HCDR3 SEQ ID NO: 257 или 118, LCDR1 SEQ ID NO: 258 или 119, LCDR2 SEQ ID NO: 259 или 120, LCDR3 SEQ ID NO: 260, 261 или 121;

В некотором варианте осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 157.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит:

HCDR1 с SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259, и LCDR3 SEQ ID NO: 260; или

HCDR1 с SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит:

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 249;

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 250;

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251;

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 252;

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 253; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 254.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH, которая по меньшей мере на

80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VH SEQ ID NO: 248 и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична VL SEQ ID NO: 251.

В конкретном варианте осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251.

В некотором варианте осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 116, HCDR2 SEQ ID NO: 117, HCDR3 SEQ ID NO: 118, LCDR1 SEQ ID NO: 119, LCDR2 SEQ ID NO: 120 и LCDR3 SEQ ID NO: 121; или

VH с SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123.

В конкретном варианте осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит первый связывающий домен, который связывает hK2, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, причем второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261.

В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен выделенного мультиспецифического белка, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336 или 337.

В конкретном варианте осуществления второй связывающий домен выделенного мультиспецифического белка, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 331.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 275, 258, 259 и 260, соответственно;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO:

136, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251; и/или

выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 351, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 136, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123; и/или

выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 351, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 260, соответственно;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 134, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251; и/или

выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 352, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1,

HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 134, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123; и/или

выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 352, HC2 SEQ ID NO: 259 и LC2 SEQ ID NO: 272.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 260, соответственно;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 325, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251; и/или

выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 353, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 260, соответственно;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331; и/или

выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 354, LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2 SEQ ID NO: 360.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок

представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186 и 187, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 260, соответственно;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 444, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331; и/или

выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 355, LC1 SEQ ID NO: 445 и HC2 SEQ ID NO: 360.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 260, соответственно;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331; и/или

выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 356, LC1 SEQ ID NO: 222, и HC2 SEQ ID NO: 360.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO:

325, а второй связывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123; и/или

выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 353, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, 209, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 316, а второй связывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123; и/или

выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 357, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, 209, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 260, соответственно;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 316, а второй связывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 151; и/или

выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 357, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1,

HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 260, соответственно;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331; и/или

выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 361, LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2 SEQ ID NO: 362.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 275, 258, 259 и 261, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

причем первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3,

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186 и 187, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, 209, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, 209, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259, и 261, соответственно; или

причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71,

соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 275, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок

представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186 и 187, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1,

HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, 209, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, 209, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 136, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 136, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 134, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 134, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 325, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 444, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 325, а второй связывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 316, а второй связывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 316, а второй связывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 151; или

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 136, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 136, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID

NO: 134, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 134, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 325, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, VH SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 444, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, VH SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок,

содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 325, а второй связывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 316, а второй связывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 316, а второй связывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 151.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В настоящем изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный белок содержит

HC1 SEQ ID NO: 351, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267;
HC1 SEQ ID NO: 351, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272;
HC1 SEQ ID NO: 352, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267;
HC1 SEQ ID NO: 352, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272;
HC1 SEQ ID NO: 353, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267;
HC1 SEQ ID NO: 354, LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2 SEQ ID NO: 360;
HC1 SEQ ID NO: 355, LC1 SEQ ID NO: 223, и HC2 SEQ ID NO: 360;
HC1 SEQ ID NO: 356, LC1 SEQ ID NO: 222, и HC2 SEQ ID NO: 360;
HC1 SEQ ID NO: 353, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272;
HC1 SEQ ID NO: 357, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272;

HC1 SEQ ID NO: 357, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267; или

HC1 SEQ ID NO: 361, LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2 SEQ ID NO: 362.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В настоящем изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный белок содержит HC1 SEQ ID NO: 351, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В настоящем изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный белок содержит HC1 SEQ ID NO: 351, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В настоящем изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный белок содержит HC1 SEQ ID NO: 352, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В настоящем изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный белок содержит HC1 SEQ ID NO: 352, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В настоящем изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный белок содержит HC1 SEQ ID NO: 353, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В настоящем изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный белок содержит HC1 SEQ ID NO: 354, LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2 SEQ ID NO: 360.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В настоящем изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный белок содержит HC1 SEQ ID NO: 355, LC1 SEQ ID NO: 223, и HC2 SEQ ID NO: 360.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В настоящем изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный белок содержит HC1 SEQ ID NO: 356, LC1 SEQ ID NO: 222, и HC2 SEQ ID NO: 360.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В настоящем изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный белок содержит HC1 SEQ ID NO: 353, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В настоящем изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный белок содержит HC1 SEQ ID NO: 357, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В настоящем изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный белок содержит HC1 SEQ ID NO: 357, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В настоящем изобретении также предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный белок содержит HC1 SEQ ID NO: 361, LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2 SEQ ID NO: 362.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок представляет собой белок антитела к hK2/антитела CD3.

В конкретном варианте осуществления предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1,

HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает CD3, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает CD3, содержит scFv SEQ ID NO: 331; и/или

выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 354, LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2 SEQ ID NO: 360.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит лизин (например, K477) на С-конце обоих доменов Fc (*m. e.*, доменов HC1 и HC2). Дополнительный лизин может усиливать экспрессию конструкции. Соответственно, в конкретном варианте осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 361, LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2 SEQ ID NO: 362.

В некоторых вариантах осуществления предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает CD3, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает CD3, содержит scFv SEQ ID NO: 331; и/или

выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 361, LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2 SEQ ID NO: 362.

В некоторых вариантах осуществления предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере не 80% идентична SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% идентична VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает CD3, содержит scFv, которая по меньшей мере на 80% идентична scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере не 85% идентична SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 85% идентична VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает CD3, содержит scFv, который по меньшей мере

на 85% идентичен scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере не 90% идентична SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 90% идентична VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает CD3, содержит scFv, которая по меньшей мере на 90% идентична scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере не 95% идентична SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает CD3, содержит scFv, который по меньшей мере на 95% идентичен scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере не 99% идентична SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 99% идентична VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает CD3, содержит scFv, который по меньшей мере на 99% идентичен scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает CD3, содержит scFv, который по меньшей мере на 95% идентичен scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 99% идентична VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает CD3, содержит scFv, который по меньшей мере на 99% идентичен scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере не 95% идентична SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает CD3, содержит scFv, который по меньшей мере на 95% идентичен scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере не 99% идентична SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает CD3, содержит scFv, который по меньшей мере на 99% идентичен scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере не 95% идентична SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 95% идентична VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает CD3, содержит scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере не 99% идентична SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 99% идентична VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает CD3, содержит scFv SEQ ID NO: 331.

В конкретном варианте осуществления предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает CD3, содержит scFv SEQ ID NO: 331.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный мультиспецифический белок содержит HC1, которая по меньшей мере на 80% идентична HC1 SEQ ID NO: 354, и LC1, которая по меньшей мере на 80% идентична LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2, которая по меньшей мере на 80% идентична HC2 SEQ ID NO: 360.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный мультиспецифический белок содержит HC1, которая по меньшей мере на 85% идентична HC1 SEQ ID NO: 354, и LC1, которая по меньшей мере на 85% идентична LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2, которая по меньшей мере на 85% идентична HC2 SEQ ID NO: 360.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный мультиспецифический белок содержит HC1, которая по меньшей мере на 90% идентична HC1 SEQ ID NO: 354, и LC1, которая по меньшей мере на 90% идентична LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2, которая по

меньшей мере на 90% идентична HC2 SEQ ID NO: 360.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный мультиспецифический белок содержит HC1, которая по меньшей мере на 95% идентична HC1 SEQ ID NO: 354, и LC1, которая по меньшей мере на 95% идентична LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2, которая по меньшей мере на 95% идентична HC2 SEQ ID NO: 360.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем выделенный мультиспецифический белок содержит HC1, которая по меньшей мере на 99% идентична HC1 SEQ ID NO: 354, и LC1, которая по меньшей мере на 99% идентична LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2, которая по меньшей мере на 99% идентична HC2 SEQ ID NO: 360.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит лизин (например, K477) на C-конце обоих доменов Fc (*т. е.,* доменов HC1 и HC2). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит HC1, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична HC1 SEQ ID NO: 361, и HC2, которая содержит C-концевой остаток лизина и по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99%) идентична HC2 SEQ ID NO: 362.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый домен, который связывает hK2, связывается с hK2 в трех или более остатках в пределах эпитопов, имеющих последовательности SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый домен, который связывает CD3, связывается с CD3 в трех или более остатках в пределах эпитопов, имеющих последовательности SEQ ID NO: 341, SEQ ID NO: 448 и SEQ ID NO: 449.

В конкретном варианте осуществления изобретения предложен выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, связывается с hK2 в трех или более остатках в пределах эпитопов, имеющих последовательности SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 112, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3, связывается с CD3 в пределах эпитопов, имеющих последовательности SEQ ID NO: 341, SEQ ID NO: 448 и SEQ ID NO: 449.

Изотипы, аллотипы и Fc-конструирование

Константная область Ig или фрагмент константной области Ig, такой как Fc-область, которая присутствует в белках по настоящему изобретению, может представлять собой любой аллотип или изотип.

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой изотип IgG1.

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой изотип IgG2.

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой изотип IgG3.

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой изотип IgG4.

Константная область Ig или фрагмент константной области Ig может иметь любой аллотип. Ожидается, что аллотип не влияет на свойства константной области Ig, такие как связывание или опосредованные Fc эффекторные функции. Иммуногенность терапевтических протеинов, содержащих константные области Ig или их фрагменты, связана с повышенным риском реакций на инфузию и сниженной длительностью терапевтического ответа (Baert et al., (2003) N Engl J Med 348:602-08). Степень, с которой терапевтические белки, содержащие константные области Ig или их фрагменты, индуцируют иммунный ответ в организме-хозяине, отчасти может определяться аллотипом константной области Ig (Stickler et al., (2011) Genes and Immunity 12:213-21). Аллотип константной области Ig связан с вариациями аминокислотной последовательности в конкретных положениях в последовательностях константных областей антитела. В **таблице 2** показаны выбранные аллотипы IgG1, IgG2 и IgG4.

Таблица 2.

Аллотип	Аминокислотный остаток в положении различия (нумерация остатков: по каталогу EU)							
	IgG2		IgG4		IgG1			
	189	282	309	422	214	356	358	431
G2m(n)	T	M						
G2m(n-)	P	V						
G2m(n)/(n-)	T	V						
nG4m(a)			L	R				
G1m(17)					K	E	M	A
G1m(17,1)					K	D	L	A
G1m(3)					R	E	M	A

В конкретном варианте осуществления аллотип константной области Ig

представляет собой huIgG1_G1m(17).

Циркулирующие эндогенные карбоксипептидазы могут удалять С-концевой лизин (CTL) из константной области Ig (Cai et al., (2011) Biotechnol Bioeng 108:404-412). Удаление CTL во время получения можно контролировать на уровне ниже максимального посредством контроля концентрации внеклеточного Zn^{2+}, этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) или ЭДТА-Fe^{3+}, как описано в патентной публикации США № US20140273092. Содержание CTL белков можно измерять с помощью известных способов.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент, который связывает hK2 и конъюгирован с константной областью Ig, имеет содержание С-концевого лизина от приблизительно 10% до приблизительно 90%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет от около 20% до около 80%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет от около 40% до около 70%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет от около 55% до около 70%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет около 60%.

Мутации Fc-области можно получить в антигенсвязывающих доменах, которые связывают hK2, конъюгированные с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, для модуляции их эффекторных функций, таких как ADCC, ADCP и/или ADCP и/или фармакокинетических свойств. Это может быть достигнуто путем введения в Fc мутации (-ий), модулирующей (-их) связывание мутантного Fc с активирующими рецепторами FcγR (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIII), ингибиторным FcγRIIb и/или с FcRn.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2s, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну мутацию в константной области Ig или в фрагменте константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация находится в Fc-области.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с константной областью Ig, конъюгированной с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать мутаций в Fc-области.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну мутацию в Fc-области, которая модулирует связывание антитела с FcRn.

Положения Fc, в которые можно вводить мутации для модуляции периода полужизни (например, связывания с FcRn), включают в себя положения 250, 252, 253, 254,

256, 257, 307, 376, 380, 428, 434 и 435. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации, являются мутации T250Q, M252Y, I253A, S254T, T256E, P257I, T307A, D376V, E380A, M428L, H433K, N434S, N434A, N434H, N434F, H435A и H435R. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации для увеличения периода полужизни, являются мутации M428L/N434S, M252Y/S254T/T256E, T250Q/M428L, N434A и T307A/E380A/N434A. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации для уменьшения периода полужизни, являются мутации H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит мутацию M252Y/S254T/T256E.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну мутацию в Fc-области, которая уменьшает связывание белка с активирующим Fcγ-рецептором (FcγR) и/или уменьшает эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) или фагоцитоз (ADCP).

Положения Fc, в которые можно вводить мутации для уменьшения связывания белка с активирующим FcγR и последующего снижения эффекторной функции, включают в себя положения 214, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 267, 268, 270, 295, 297, 309, 327, 328, 329, 330, 331 и 365. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации, являются мутации K214T, E233P, L234V, L234A, делеция G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, A330S и P331S в IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Примерами комбинаций мутаций, которые приводят к получению белков со сниженной ADCC, являются мутации L234A/L235A в IgG1, L234A/L235A/D265S в IgG1, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S в IgG2, F234A/L235A в IgG4, S228P/F234A/L235A в IgG4, N297A во всех изотипах Ig, V234A/G237A в IgG2, K214T/E233P/L234V/L235A/G236-делеция/A327G/P331A/D365E/L358M в IgG1, H268Q/V309L/A330S/P331S в IgG2, S267E/L328F в IgG1, L234F/L235E/D265A в IgG1, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S в IgG1, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S в IgG4 и S228P/F234A/L235A/G236-делеция/G237A/P238S в IgG4. Можно также применять гибридные домены Fc IgG2/4, такие как Fc с остатками 117-260 из IgG2 и остатками 261-447 из IgG4.

Примером мутации, которая приводит к получению белков со сниженной CDC, является мутация K322A.

Для усиления стабильности IgG4 в IgG4 можно выполнять известную мутацию S228P.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну мутацию, которую выбирают из группы, состоящей из K214T, E233P, L234V, L234A, делеция G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, K322, A330S и P331S.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит мутацию L234A/L235A/D265S. В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с константной областью IgG1 или с фрагментом константной области IgG1, содержащей мутации L234A_L235A_D265S.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит мутацию L234A/L235A.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домн, который связывает hK2, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну мутацию в Fc-области, которая усиливает связывание белка с Fcγ-рецептором (FcγR) и/или усиливает эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или фагоцитоз (ADCP).

Положения Fc, в которые можно вводить мутации для увеличения связывания белка с активирующим FcγR и/или для усиления эффекторных функций Fc, включают в себя положения 236, 239, 243, 256, 290, 292, 298, 300, 305, 312, 326, 330, 332, 333, 334, 345, 360, 339, 378, 396 или 430 (нумерация остатков соответствует каталогу EC). Примерами мутаций, которые можно выполнять по отдельности или в комбинации, являются G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305L, K326A, A330K, I332E, E333A, K334A, A339T и P396L. Примеры комбинаций мутаций, которые позволяют получать белки с повышенными ADCC или ADCP, представляют собой S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E.

Положения Fc, в которые можно вводить мутации для усиления CDC, включают в себя положения 267, 268, 324, 326, 333, 345 и 430. Примерами мутаций, которые можно выполнять по отдельности или в комбинации, являются S267E, F1268F, S324T, K326A, K326W, E333A, E345K, E345Q, E345R, E345Y, E430S, E430F и E430T. Примерами комбинаций мутаций, которые позволяют получать белки с уменьшением CDC, являются K326A/E333A, K326W/E333A, H268F/S324T, S267E/H268F, S267E/S324T и S267E/H268F/S324T.

Конкретные мутации, описанные в настоящем документе, представляют собой

мутации по сравнению с IgG1, IgG2 и IgG4 с диким типом аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 130, 131 и 132, соответственно.

SEQ ID NO: 130, IgG1 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSS

GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGG

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYN

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDE

LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRW

QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 131; IgG2 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSS

GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVA
GPSVF

LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTFR

VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKN

QVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGN

VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 132; IgG4 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSS

GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFL
GGPSV

FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTY

RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTK

NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEG

NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Связывание антитела с FcγR или FcRn можно оценивать с использованием проточной цитометрии на клетках, сконструированных для экспрессии каждого из

рецепторов. В примере анализа связывания в 96-луночный планшет высевают 2×10^5 клеток на лунку и блокируют буферным раствором для окрашивания с бычьим сывороточным альбумином (БСА) (BD Biosciences, г. Сан-Хосе, США) в течение 30 мин при 4 °С. Клетки инкубируют с исследуемым антителом на льду в течение 1,5 ч при 4 °С. После двукратного промывания буферным раствором для окрашивания BSA клетки инкубируют с меченым R-фикоэритрином (R-PE) вторичным антителом к человеческому IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories) в течение 45 мин при 4 °С. Клетки дважды промывают в буферном растворе для окрашивания, после чего повторно суспендируют в 150 мкл буферного раствора для окрашивания, содержащего разведенный в соотношении 1 : 200 краситель DRAQ7 для живых/мертвых клеток (Cell Signaling Technology, г. Данверс, США). Сигналы PE и DRAQ7 от окрашенных клеток определяют с помощью проточного цитометра Miltenyi_MACSQuant (Miltenyi Biotec, г. Оберн, США) с использованием, соответственно, каналов B2 и B4. Живые клетки гейтируют по исключению DRAQ7, а средние геометрические значения сигналов флуоресценции определяют для сбора по меньшей мере 10 000 случаев живых клеток. Для анализа используют программное обеспечение FlowJo (Tree Star). Данные наносят на график как логарифм концентрации антител в зависимости от средних значений сигналов флуоресценции. Проводят нелинейный регрессионный анализ.

Гликоинженерия

Способность антигенсвязывающего домена, связывающего hK2, конъюгированного с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, опосредовать ADCC можно повысить путем конструирования константной области Ig или фрагмента олигосахаридного компонента константной области Ig. IgG1 или IgG3 человека претерпевают N-гликозилирование по Asn297 большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. С помощью несконструированных клеток CHO можно получить константную область Ig, содержащую протеин, которая, как правило, имеет содержание фукозы в гликанах по меньшей мере около 85%. Удаление коровой фукозы из олигосахаридов типа 2-антеннарного комплекса, присоединенной к антигенсвязывающему домену, который связывает hK2, конъюгированному с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, усиливает ADCC белка посредством улучшенного связывания FcγRIIIa без изменения связывания антигенов или активности CDC. Такие белки можно получать, используя различные способы, которые, по имеющимся данным, приводят к успешной экспрессии иммуноглобулинов с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антеннарного комплекса, такие как контроль осмоляльности культуральной среды (Konno et al., Cytotechnology 64:249-65, 2012), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO Lec13 (Shields et al., J Biol Chem 277:26733-26740, 2002), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии клеток CHO EB66 (Olivier et al., MAbs;2(4): 405-415, 2010; PMID:20562582), применение линии клеток гибридомы крыс YB2/0 в качестве линии клеток-хозяев (Shinkawa et al., J

Biol Chem 278:3466-3473, 2003), введение малой интерферирующей РНК, специфичной к гену 1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., Biotechnol Bioeng 88:901-908, 2004), или коэкспрессия β-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и α-маннозидазы II комплекса Гольджи, или применение сильного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara et al., J Biol Chem 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., Biotechnol Bioeng 93:851-861, 2006; Xhou et al., Biotechnol Bioeng 99:652-65, 2008).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig по изобретению, имеет биантеннарную структуру гликанов с содержанием фукозы от около 1% до около 15%, например около 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, имеет структуру гликана с содержанием фукозы около 50%, 40%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% или 20%.

Термин «содержание фукозы» означает количество моносахарида фукозы в пределах сахаридной цепи в положении Asn297. Относительное количество фукозы представляет собой процентное содержание фукозосодержащих структур, относящихся ко всем гликоструктурам. Они могут характеризоваться и количественно определяться множеством способов, например: 1) при помощи времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF) пробы, обработанной N-гликозидазой F (например, комплексные, гибридные, олигоманнозные и высокоманнозные структуры), как описано в международной патентной заявке № WO2008/077546 2); 2) посредством ферментативного высвобождения гликанов Asn297 с последующей дериватизацией и обнаружением/количественным определением методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (сверхэффективной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ)) с флуоресцентным обнаружением и/или высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) (сверхэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС)); 3) анализом интактного белка нативного или восстановленного мАт с обработкой или без обработки гликанов Asn297 ферментом Endo S или другим ферментом, который расщепляет связь между первым и вторым моносахаридами GlcNAc и при этом сохраняет соединение фукозы и первого GlcNAc; 4) расщеплением мАт на составляющие его пептиды посредством ферментативного расщепления (например, трипсин или эндопептидаза Lys-C) и последующим разделением, обнаружением и количественным определением посредством ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС); 5) отделением олигосахаридов мАт от белка мАт посредством специфического ферментативного дегликозилирования с PNGase F на Asn 297. Высвобожденные таким образом олигосахариды можно метить флуорофором, разделять и идентифицировать различными вспомогательными методами, которые позволяют: точно охарактеризовать структуры гликанов посредством масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI) путем сравнения

экспериментальных масс с теоретическими массами, определить степень сиалилирования с помощью ионообменной ВЭЖХ (GlycoSep C), разделить и количественно оценить формы олигосахаридов по критерию гидрофильности с помощью ВЭЖХ с обычной фазой (GlycoSep N) и разделить и количественно оценить формы олигосахаридов с помощью высокоэффективного капиллярного электрофореза с лазер-индуцированной флуоресценцией (HPCE-LIF).

Используемый в настоящем документе термин «низкий уровень фукозы» или «низкое содержание фукозы» относится к антигенсвязывающему домену, который связывает hK2, конъюгированному с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, с содержанием фукозы около 1-15%.

Используемый в настоящем документе термин «нормальный уровень фукозы» или «нормальное содержание фукозы» относится к антигенсвязывающему домену, который связывает hK2, конъюгированному с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, с содержанием фукозы около 50%, обычно около 80% или более 85%.

Антиидиотипические антитела

Антиидиотипические антитела представляют собой антитела, которые специфически связываются с антигенсвязывающим доменом, который связывает hK2 по изобретению.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, которое специфически связывается с антигенсвязывающим доменом, который связывает hK2 по изобретению.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, которое специфически связывается с антигенсвязывающим доменом, который связывает hK2, содержащим

VH с SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138;
VH с SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163;
VH с SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165;
VH с SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167;
VH с SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169;
VH с SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205.
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 160;

VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140; или
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 160.

Антиидиотипическое (Id) антитело является антителом, распознающим антигенные детерминанты (например, паратоп или CDR) антитела. Id-антитело может быть блокирующим или неблокирующим антиген. Антигенблокирующий Id можно использовать для обнаружения свободного антигенсвязывающего домена в образце (*например,* антигенсвязывающего домена, который связывает hK2 по изобретению). Неблокирующее Id-антитело можно применять для обнаружения всех антител (свободных, частично связанных с антигеном или полностью связанных с антигеном) в пробе. Id-антитело можно получать путем иммунизации животного антителом, для которого получают анти-Id-антитело.

Анти-Id-антитело также можно применять в качестве иммуногена для индукции иммунного ответа у еще одного животного, получая так называемое анти-анти-Id-антитело. Анти-анти-Id-антитело может быть эпитопно идентично первичному антигенсвязывающему домену, который индуцировал анти-Id. Таким образом, используя антитела к идиотипическим детерминантам антигенсавязывающего домена, можно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антигенсвязывающие домены идентичной специфичности. Антиидиотипические антитела можно изменять (тем самым продуцируя варианты антиидиотипических антител) и/или дериватизировать любым приемлемым методом, таким как раскрытый в настоящем документе.

Иммуноконъюгаты

Антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2 по изобретению,

представляют собой белки, содержащие антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2, или мультиспецифические белки, которые содержат антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2 (в совокупности называемые в данном документе белками, связывающими hK2), могут быть конъюгированы с гетерологичной молекулой. Белок, связывающий hK2, также включает химерные антигенные рецепторы (CAR), которые содержат антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2 по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная молекула представляет собой обнаруживаемую метку или цитотоксический агент.

В изобретении также предложен антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с обнаруживаемой меткой.

В изобретении также предложен белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с обнаруживаемой меткой.

В изобретении также предложен мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с обнаруживаемой меткой.

В изобретении также предложен CAR, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с обнаруживаемой меткой.

В изобретении также предложен антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с цитотоксическим агентом.

В изобретении также предложен белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с цитотоксическим агентом.

В изобретении также предложен мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с цитотоксическим агентом.

В изобретении также предложен CAR, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с цитотоксическим агентом.

Белки, связывающие hK2, по изобретению можно использовать для направления терапевтического средства к клеткам, экспрессирующим hK2, таким как клетки рака предстательной железы или рака молочной железы. Альтернативно клетки, экспрессирующие hK2, могут быть мишенями для белка, связывающего hK2, по изобретению, связанного с терапевтическим средством, предназначенным для модификации клеточной функции после интернализации.

В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка также является цитотоксическим агентом.

Белки, связывающие hK2, по изобретению, конъюгированные с обнаруживаемой меткой, можно использовать для оценки экспрессии hK2 на различных образцах.

Обнаруживаемые метки включают композиции, которые при конъюгировании с белком, связывающим hK2, по изобретению делают его обнаружимым посредством спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических или химических средств.

Примеры обнаруживаемых меток включают в себя радиоактивные изотопы, магнитные гранулы, металлические гранулы, коллоидные частицы, флуоресцентные красители, электроноплотные реагенты, ферменты (например, широко используемые в иммуноферментном анализе (ИФА)), биотин, дигоксигенин, гаптены, люминисцентные молекулы, хемилюминесцентные молекулы, флуорохромы, флуорофоры, гасящие флуоресценцию агенты, цветные молекулы, радиоактивные изотопы, сцинтиллирующие средства, авидин, стрептавидин, белок A, белок G, антитела или их фрагменты, полигистидин, Ni^{2+}, Flag-маркеры, myc-маркеры, тяжелые металлы, ферменты, щелочная фосфатаза, пероксидаза, люцифераза, доноры/акцепторы электронов, сложные эфиры акридиния и колориметрические субстраты.

Обнаруживаемая метка может испускать сигнал спонтанно, например, когда обнаруживаемая метка представляет собой радиоактивный изотоп. В других случаях обнаруживаемая метка испускает сигнал в результате стимуляции внешним полем.

Примерами радиоактивных изотопов могут быть γ-излучающие, Оже-электрон-излучающие, β-излучающие, альфа-излучающие или позитрон-излучающие радиоактивные изотопы. К примерам радиоактивных изотопов относятся ^{3}H, ^{11}C, ^{13}C, ^{15}N, ^{18}F, ^{19}F, ^{55}Co, ^{57}Co, ^{60}Co, ^{61}Cu, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{68}Ga, ^{72}As, ^{75}Br, ^{86}Y, ^{89}Zr, ^{90}Sr, ^{94m}Tc, ^{99m}Tc, ^{115}In, $^{123}1$, $^{124}1$, ^{125}I, $^{131}1$, ^{211}At, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{223}Ra, ^{226}Ra, ^{225}Ac и ^{227}Ac.

К примерам атомов металлов относятся металлы с атомным номером более 20, например атомы кальция, атомы скандия, атомы титана, атомы ванадия, атомы хрома, атомы марганца, атомы железа, атомы кобальта, атомы никеля, атомы меди, атомы цинка, атомы галлия, атомы германия, атомы мышьяка, атомы селена, атомы брома, атомы криптона, атомы рубидия, атомы стронция, атомы иттрия, атомы циркония, атомы ниобия, атомы молибдена, атомы технеция, атомы рутения, атомы родия, атомы палладия, атомы серебра, атомы кадмия, атомы индия, атомы олова, атомы сурьмы, атомы теллура, атомы йода, атомы ксенона, атомы цезия, атомы бария, атомы лантана, атомы гафния, атомы тантала, атомы вольфрама, атомы рения, атомы осмия, атомы иридия, атомы платины, атомы золота, атомы ртути, атомы таллия, атомы свинца, атомы висмута, атомы франция, атомы радия, атомы актиния, атомы церия, атомы празеодима, атомы неодима, атомы прометия, атомы самария, атомы европия, атомы гадолиния, атомы тербия, атомы диспрозия, атомы гольмия, атомы эрбия, атомы туллия, атомы иттербия, атомы лютеция, атомы тория, атомы протактиния, атомы урана, атомы нептуния, атомы плутония, атомы америция, атомы кюрия, атомы берклия, атомы калифорния, атомы эйнштейния, атомы фермия, атомы менделевия, атомы нобелия или атомы лоуренсия.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой щелочноземельные металлы с атомным номером более двадцати.

В некоторых вариантах осуществления атомы металлов могут представлять собой лантаниды.

В некоторых вариантах осуществления атомы металлов могут представлять собой актиниды.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой переходные металлы.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой постпереходные металлы.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой атомы золота, атомы висмута, атомы тантала и атомы гадолиния.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой металлы с атомным номером от 53 (т. е. йод) до 83 (т. е. висмут).

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой атомы, приемлемые для магнитно-резонансной томографии.

Атомы металлов могут представлять собой ионы металлов со степенью окисления +1, +2, +3, например Ba^{2+}, Bi^{3+}, Cs^{+}, Ca^{2+}, Cr^{2+}, Cr^{3+}, Cr^{6+}, Co^{2+}, Co^{3+}, Cu^{+}, Cu^{2+}, Cu^{3+}, Ga^{3+}, Gd^{3+}, Au^{+}, Au^{3+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, F^{3+}, Pb^{2+}, Mn^{2+}, Mn^{3+}, Mn^{4+}, Mn^{7+}, Hg^{2+}, Ni^{2+}, Ni^{3+}, Ag^{+}, Sr^{2+}, Sn^{2+}, Sn^{4+} и Zn^{2+}. Атомы металлов могут включать в себя оксид металла, такой как оксид железа, оксид марганца или оксид гадолиния.

Приемлемые красители включают в себя любые присутствующие на рынке красители, такие как, например, 5(6)-карбоксифлуоресцеин, малеимид IRDye 680RD или IRDye 800CW, красители на основе комплекса рутений/полипиридил и т. п.

К приемлемым флуорофорам относятся флуоресцеин изотиоцианат (FITC), флуоресцеин тиосемикарбазид, родамин, Texas Red, красители CyDye (например, Cy3, Cy5, Cy5.5), красители Alexa Fluor (например, Alexa488, Alexa555, Alexa594; Alexa647), флуоресцентные красители ближнего ИК-диапазона (NIR) (700-900 нм) и карбоцианиновые и аминостирильные красители.

Антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с обнаруживаемой меткой, может использоваться в качестве агента визуализации.

Белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с обнаруживаемой меткой, может использоваться в качестве агента визуализации.

Мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с обнаруживаемой меткой, может использоваться в качестве агента визуализации.

CAR, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгированный с обнаруживаемой меткой, может использоваться в качестве агента визуализации.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой химиотерапевтический препарат, лекарственное средство, ингибирующий рост агент, токсин (например, токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, обладающий ферментативной активностью, или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (т. е. радиоактивный конъюгат).

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой

дауномицин, доксорубицин, метотрексат, виндезин, бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, рицин, гелданамицин, мейтансиноиды или калихеамицин. Цитотоксический агент может индуцировать цитотоксический и цитостатический эффекты посредством механизмов, включающих связывание с тубулином, связывание с ДНК или ингибирование топоизомеразы.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой токсин с ферментативной активностью, такой как А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из Pseudomonas aeruginosa), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки Aleurites fordii, диантиновые белки, белки Phytolaca americana (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор momordica charantia, курцин, кротин, ингибитор sapaonaria officinali, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой радионуклид, такой как ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y и ^{186}Re.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой долостатины или пептидные аналоги и производные долостатина, ауристатин или монометилауристатин фенилаланин. Примеры молекул описаны в патентах США № 5,635,483 и № 5,780,588. Показано, что долостатины и ауристатины блокируют динамику микротрубочек, гидролиз ГТФ и деление ядра и клетки (Woyke et al (2001) Antimicrob Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) и обладают противораковой и противогрибковой активностью. Функциональная группа лекарственного средства долостатина или ауристатина может быть присоединена к антителу по изобретению, посредством N (амино) конца или С (карбоксильного) конца функциональной группы пептидного лекарственного средства (WO02/088172) или посредством любого цистеина, искусственно внедренного в антитело.

Белки, связывающие hK2, по изобретению могут быть конъюгированы с обнаруживаемой меткой с использованием известных способов.

В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка находится в комплексе с хелатирующим агентом.

В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка конъюгирована с белками, связывающими hK2, по изобретению посредством линкера.

Обнаружтваемая метка или цитотоксический фрагмент могут быть связаны непосредственно, или опосредованно, с белками, связывающими hK2, по изобретению с использованием известных способов. К подходящим линкерам, известным в данной области, относятся, например, простетические группы, нефенольные линкеры (производные N-сукцинимидилбензоатов; додекарборат), хелатирующие группы как макролитических, так и ациклических хелаторов, например производные 1,4,7,10-тетраазациклododекан-1,4,7,10,-тетрауксусной кислоты (DOTA), производные диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA), производные S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусной кислоты (NOTA) и

производные 1,4,8,11-тетраазациклододекан-1,4,8,11-тетрауксусной кислоты (TETA), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол) пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), дифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидные соединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные фтористые соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол) и другие хелатирующие группы. Подходящие пептидные линкеры хорошо известны.

В некоторых вариантах осуществления белки, связывающие hK2, по изобретению удаляют из крови посредством почечного клиренса.

Наборы

В изобретении также предложен набор, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2.

В изобретении также предложен набор, включающий белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2.

В изобретении также предложен набор, включающий мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2.

В изобретении также предложен набор, включающий CAR, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2.

Набор можно применять для терапевтических областей применения и в виде диагностических наборов.

Набор можно применять для обнаружения наличия hK2 в образце.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит белок, связывающий hK2, по изобретению и реагенты для обнаружения белка, связывающего hK2. Набор может содержать один или более из других элементов: инструкцию по применению; другие реагенты, например метку, терапевтический агент или агент, используемый для хелатирования или иного сочетания, антитело для мечения, или терапевтический агент, или радиозащитную композицию; устройства или другие материалы для подготовки антитела к введению; фармацевтически приемлемые носители и устройства или другие материалы для введения пациенту.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, находящийся в контейнере, и инструкции по применению набора.

В некоторых вариантах осуществления набор включает белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, находящийся в контейнере, и инструкции по применению набора.

В некоторых вариантах осуществления набор включает мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, находящийся в контейнере, и инструкции по применению набора.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, находящийся в наборе, имеет метку.

В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, находящийся в наборе, имеет метку.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, находящийся в наборе, имеет метку.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, который содержит

VH с SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138;
VH с SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163;
VH с SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165;
VH с SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167;
VH с SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169;
VH с SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205.
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 2;

VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 3;

VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140; или

VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 160.

В конкретном варианте осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержащий VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержащий SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 133, 134, 135, 136, 308, 316, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 404, 405, 406, 407, 408 или 409.

Способы обнаружения hK2

В изобретении также предложен способ обнаружения hK2 в пробе, включающий в себя получение пробы, приведение в контакт с пробой, содержащей антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, и обнаружение связанного с hK2 в пробе.

В некоторых вариантах осуществления пробу можно получать из мочи, крови, сыворотки крови, плазмы крови, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, синовиальной жидкости, циркулирующих клеток, клеток, не связанных с тканями (т. е. свободных клеток), тканей (например, резецированной хирургическим путем ткани, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т. п.

Антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, можно обнаружить с использованием известных способов. Примеры способов включают в себя прямое мечение антител с использованием флуоресцентных или хемилюминесцентных меток или радиоактивных меток или присоединение к антителам по изобретению легко обнаруживаемой функциональной группы, такой как биотин, ферменты или эпитопные метки. Примерами меток и функциональных групп являются рутений, ^{111}In-DOTA, ^{111}In-диэтилентриаминпентауксусная кислота (DTPA), пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и бета-галактозидаза, полигистидин (HIS-метка), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители и красители Alexafluor®.

Антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, можно использовать в ряде анализов для обнаружения hK2 в пробе. Примерами анализов являются анализ методом вестерн-блоттинга, радиоиммунологический анализ, поверхностный плазмонный резонанс, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммуноанализ, иммуногистохимический анализ, сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или твердофазный ИФА.

Химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2 по изобретению

Любой из антигенсвязывающих доменов, которые связывают hK2, идентифицированные в настоящем документе, могут быть конструированы в химерный антигенный рецептор (CAR) для получения CAR, которые связывают hK2. Данное

изобретение относится к CAR, которые нацелены на hK2, на клетки, содержащие такие CAR, и на способы лечения рака, продуцирующего hK2, такого как рак предстательной железы, с использованием CAR, описанных в настоящем документе.

CAR по настоящему изобретению имеют антигенную специфичность в отношении hK2. В контексте настоящего документе фразы «имеет антигенную специфичность» и «вызывают антигенспецифический ответ» означает, что CAR может специфически связываться с антигеном и иммунологически распознавать его, так что связывание CAR с антигеном hK2 вызывает иммунный ответ. Способы тестирования CAR на антигенную специфичность и на способность распознавать клетки-мишени известны в данной области техники.

Настоящее изобретение относится к применению Т-клеток, которые были генетически модифицированы для стабильной экспрессии желаемого химерного антигенного рецептора. Химерный антигенный рецептор (CAR) представляет собой искусственно сконструированный гетерологичный белок или полипептид, содержащий антигенсвязывающий домен антитела (такой как scFv), связанный с сигнальными доменами Т-клеток. Характеристики CAR включают в себя их способность перенаправлять Т-клеточную специфичность и реактивность к выбранной мишени не рестриктированным по MHC образом с использованием антигенсвязывающих свойств моноклональных антител. Не рестриктированное по ГКГС распознавание антигена дает Т-клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антигены независимо от процессинга антигена, таким образом обходя основной механизм ускользания опухоли от иммунологического ответа. Более того, при экспрессии в Т-клетках CAR преимущественно не димеризуются с эндогенными альфа- и бета-цепями Т-клеточного рецептора (TCR).

CAR, описанные в данном документе, обеспечивают рекомбинантные полипептидные конструкции, содержащие по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен (также называемый в данном документе «цитоплазматическим сигнальным доменом»), содержащие функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы, как описано ниже. Т-клетки, экспрессирующие CAR, называются в данном документе CAR Т-клетками, CAR-Т-клетками или CAR-модифицированными Т-клетками, и эти термины используются взаимозаменяемо в данном документе. Клетка может быть генетически модифицирована таким образом, чтобы стабильно экспрессировать на своей поверхности связывающий домен антитела, придавая новую антигенную специфичность, которая не зависит от ГКГС.

В некоторых случаях Т-клетку генетически модифицируют для стабильной экспрессии CAR, который объединяет домен распознавания антигена антитела с внутриклеточным доменом дзета-цепи CD3 или белка FcγRI в один химерный белок. В одном варианте осуществления стимулирующая молекула представляет собой дзета-цепь, ассоциированную с Т-клеточным рецепторным комплексом.

Термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к внутриклеточному участку молекулы. Именно функциональный участок белка действует путем передачи информации внутри клетки для регуляции клеточной активности через определенные сигнальные пути, генерируя вторичные мессенджеры или действуя как эффекторы, отвечая на такие мессенджеры. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который вызывает иммунную эффекторную функцию клетки, содержащей CAR, например, CAR-T-клетки. К примерам иммунной эффекторной функции, например, в CAR-T-клетке, относится цитолитическая активность и хелперная активность, включая секрецию цитокинов.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен. К примерам первичных внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные от молекул, которые отвечают за первичную стимуляцию или стимуляцию, зависящую от антигена. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий внутриклеточный домен. К примерам костимулирующих внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные из молекул, которые отвечают за костимулирующие сигналы или антиген-зависимую стимуляцию. Например, в случае CAR-T первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит цитоплазматическую последовательность Т-клеточного рецептора, а костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен содержит цитоплазматическую последовательность корецептора или костимулирующей молекулы.

Первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный мотив, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Примеры первичных цитоплазматических сигнальных последовательностей, содержащих ITAM, включают последовательности, полученные из CD3-дзета, FcRγ, FcR бета, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD66d, DAP10 и DAP12.

Термин «дзета» или альтернативно «дзета-цепь», «CD3-дзета» или «TCR-дзета» определяется как белок, представленный по номеру доступа GenBank BAG36664.1, или эквивалентные остатки, полученные от видов, отличных от человека, например, мыши, кролика, примата, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., и «стимулирующий домен дзета», или альтернативно «стимулирующий домен CD3-дзета», или «стимулирующий домен TCR-дзета» определяется как аминокислотные остатки из цитоплазматического домена дзета-цепи, которые достаточны для функциональной передачи исходного сигнала, необходимого для активации Т-клетки. В одном аспекте цитоплазматический домен дзета содержит остатки от 52 до 164 согласно номеру доступа в GenBank BAG36664.1 или эквивалентные остатки, полученные от видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., которые представляют собой их функциональные ортологи. В одном аспекте «стимулирующий домен дзета» или «стимулирующий домен CD3-дзета » представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, или последовательность,

имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности SEQ ID NO: 28.

SEQ ID NO: 28 CD3-дзета-стимулирующий домен

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR

Термин «костимулирующая молекула» относится к когнатному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, опосредуя, таким образом, костимулирующий ответ Т-клетки, такой как, помимо прочего, пролиферация. Костимулирующие молекулы являются молекулами клеточной поверхности, отличными от рецепторов антигенов или их лигандов, которые необходимы для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие молекулы включают, без ограничений, молекулу MHC класса 1, BTLA и Toll-подобный рецептор, а также OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) и 4-1BB (CD137).

Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой внутриклеточный участок костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула может быть представлена в следующих семействах белков: Белки рецептора ФНО, иммуноглобулиноподобные белки, рецепторы цитокинов, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клеток. К примерам подобных молекул относится CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, MyD88, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83 и т. п.

Внутриклеточный сигнальный домен может содержать весь внутриклеточный участок или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой он был получен, или его функциональный фрагмент.

Термин «4-1BB» или альтернативно «CD137» относится к члену суперсемейства РФНО с аминокислотной последовательностью, представленной по номеру доступа GenBank AAA62478.2, или эквивалентными остатками, полученными от видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п.; и «костимулирующий домен 4-1BB» определяется как аминокислотные остатки 214-255 с номером доступа в GenBank: AAA62478.2 или эквивалентные остатки, полученные от видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п. В одном аспекте «костимулирующий домен 4-1BB» или «костимулирующий домен CD137» представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27 (KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL; SEQ ID NO: 27) или эквивалентные остатки, полученные от видов, отличных от человека, например, мыши,

грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., или последовательности, имеющей по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности SEQ ID NO: 27.

В одном варианте осуществления используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из других доменов в CAR. В еще одном варианте осуществления трансмембранный домен может быть выбран из или модифицирован посредством аминокислотного замещения во избежание связывания таких доменов с их трансмембранными доменами или различными белками поверхностной мембраны для сведения к минимуму взаимодействий с другими членами комплекса рецепторов. В одном варианте осуществления трансмембранный домен содержит шарнирный домен CD8α.

В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или более функциональных сигнальных доменов, полученных из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, как определено в данном документе. В одном варианте осуществления костимулирующая молекула выбрана из 4-1BB (*m. e.*, CD137), CD27, CD3-дзета и/или CD28. CD28 является Т-клеточным маркером, важным для Т-клеточной костимуляции. CD27 является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли и выступает в качестве костимулирующей молекулы иммунной контрольной точки. 4-1BB передает мощный костимулирующий сигнал на Т-клетки, стимулируя дифференцировку и повышая долгосрочную выживаемость Т-лимфоцитов. CD3-дзета связывается с TCR для генерации сигнала и содержит иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM). В другом варианте осуществления костимулирующая молекула представляет собой MyD88 или CD40.

В одном варианте осуществления CAR содержит внутриклеточный шарнирный домен, включающий CD8α, и внутриклеточный сигнальный домен рецептора Т-клеток, содержащий CD28, 4-1BB и CD3-дзета. В другом варианте осуществления CAR содержит внутриклеточный шарнирный домен и внутриклеточный сигнальный домен рецептора Т-клеток, содержащий CD28,4-1BB и CD3-дзета, причем шарнирный домен содержит всю внеклеточную область CD8, CD4 или CD28 или ее часть; всю константную область антитела или ее часть; весь FcγRIIIA рецептор или его часть, всю шарнирную область IgG, шарнирную область IgM, шарнирную область IgA, шарнирную область IgD, шарнирную область IgE или шарнирную область Ig или части этих областей. Шарнирная область IgG может быть получена из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM1, IgM2, IgA1, IgA2, IgD, IgE или их химеры.

CAR, описанные в данном документе, обеспечивают рекомбинантные полипептидные конструкции, содержащие по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен (также называемый в данном документе «цитоплазматическим сигнальным

доменом»), *например*, содержащие функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы, как определено ниже

В одном варианте осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном варианте осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном варианте осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий по меньшей мере два функциональных сигнальных домена, полученных из одной или более костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы.

CAR по изобретению могут быть сконструированы так, чтобы содержать сигнальный домен CD28 и/или 4-1BB по отдельности или быть объединенными с любым другим желаемым цитоплазматическим доменом(-ами), пригодным в контексте CAR по изобретению. В одном варианте осуществления цитоплазматический домен CAR может дополнительно содержать сигнальный домен CD3-дзета. Например, цитоплазматический домен CAR может включать, без ограничений, сигнальные модули CD3-дзета, 4-1BB и CD28 и их комбинации. Соответственно, в изобретении предложены CAR Т-клетки и способы их применения в адоптивной терапии.

В изобретении дополнительно предложены варианты, например, функциональные варианты, CAR. Используемый в настоящем документе термин «функциональный вариант» относится к CAR, имеющему существенную или значительную идентичность последовательности или сходство с исходным CAR, причем функциональный вариант сохраняет биологическую активность CAR, для которого он является вариантом. Функциональные варианты включают, например, те варианты CAR, которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени в аналогичной степени, в той же степени или в большей степени, как и исходный CAR. По отношению к исходному CAR функциональный вариант может быть, например, на по меньшей мере около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более идентичен по аминокислотной последовательности исходному CAR.

Функциональный вариант может, например, содержать аминокислотную последовательность исходного CAR с по меньшей мере одной консервативной аминокислотной заменой. В другом варианте осуществления функциональный вариант может содержать аминокислотную последовательность исходного CAR с по меньшей мере одной неконсервативной аминокислотной заменой. В данном случае

неконсервативная аминокислотная замена может не препятствовать или не ингибировать биологическую активность функционального варианта. Неконсервативная аминокислотная замена может усиливать биологическую активность функционального варианта таким образом, что биологическая активность функционального варианта увеличивается по сравнению с исходным CAR.

Консервативные аминокислотные замены известны в данной области техники и описаны в настоящем документе.

CAR по изобретению могут состоять по существу из указанной аминокислотной последовательности или последовательностей, описанных в данном документе, так что другие компоненты, например, другие аминокислоты, существенно не изменяют биологическую активность функционального варианта.

CAR по изобретению (включая функциональные участки функциональные варианты) могут иметь любую длину, *т. е.*, могут содержать любое количество аминокислот, при условии что CAR (или их функциональные участки, или их функциональные варианты) сохраняют свою биологическую активность, например, способность специфически связываться с антигеном, обнаруживать пораженные клетки (например, раковые клетки) в организме-хозяине, или лечить или предотвращать заболевание в организме-хозяине и т. д. Например, полипептид может иметь длину от около 50 до около 5000 аминокислот, например, около 50, около 70, около 75, около 100, около 125, около 150, около 175, около 200, около 225, около 250, около 275, около 300, около 325, около 350, около 375, около 400, около 425, около 450, около 475, около 500, около 525, около 550, около 575, около 600, около 625, около 650, около 675, около 700, около 725, около 750, около 775, около 800, около 825, около 850, около 875, около 900, около 925, около 950, около 975, около 1000 или более аминокислот.

CAR по изобретению (включая функциональные участки и функциональные варианты по изобретению) могут содержать синтетические аминокислоты вместо одной или более природных аминокислот. Такие синтетические аминокислоты известны в данной области техники и включают, например, аминоциклогексанкарбоновую кислоту, норлейцин, α-амино-н-декановую кислоту, гомосерин, S-ацетиламинометилцистеин, транс-3- и транс-4-гидроксипролин, 4-аминофенилаланин, 4-нитрофенилаланин, α-(2-амино-2-норборнан)-карбоновую кислоту, α,γ-диаминомасляную кислоту, α,β-диаминопропионовую кислоту, гомофенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 4-карбоксифенилаланин, β-фенилсерин β-гидроксифенилаланин, фенилглицин, α-нафтилаланин, циклогексилаланин, циклогексилглицин, N′-бензил-N′-метил-лизин, N′,N′-дибензил-лизин, 6-гидроксилизин, орнитин, α-аминоциклопентан-карбоновую кислоту, α-аминоциклогексанкарбоновую кислоту, α-аминоциклогептанкарбоновую кислоту, индолин-2-карбоновую кислоту, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, аминомалоновую кислоту, моноамид аминомалоновой кислоты и α-трет-бутилглицин.

CAR по изобретению (включая функциональные участки и функциональные варианты) могут подвергаться посттрансляционным модификациям. Они могут быть

гликозилированными, этерифицированными, N-ацилированными, амидированными, карбоксилированными, фосфорилированными, этерифицированными, циклизированными посредством, например, дисульфидного мостика или превращены в кислотно-аддитивную соль. В некоторых вариантах осуществления они димеризованы, или полимеризованы, или конъюгированы.

CAR по изобретению (включая функциональные участки и их функциональные варианты) могут быть получены способами, известными в данной области техники. Подходящие способы синтеза de novo полипептидов и белков описаны в публикациях, таких как Chan et al., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc.,2000; и Epitope Mapping, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2001. Кроме того, CAR могут быть получены рекомбинантным способом с использованием нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, с использованием стандартных рекомбинантных способов. Кроме того, некоторые из CAR по изобретению (включая их функциональные участки и их функциональные варианты) могут быть выделены и/или очищены из источника, такого как растение, бактерия, насекомое, млекопитающее и т. д. Способы выделения и очистки известны в данной области техники. Альтернативно CAR по изобретению (включая их функциональные участки и их функциональные варианты) могут быть синтезированы на коммерческой основе. В этом отношении CAR, полипептиды и белки могут быть синтетическими, рекомбинантными, выделенными и/или очищенными.

В изобретении также предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с эпитопом CAR по изобретению. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь любой уровень аффинности или авидности для функционального участка CAR. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент может связывать hK2 в некотором диапазоне аффинности (K_D). В одном варианте осуществления антитело связывается с hK2 со значением K_D, равным или составляющим менее чем приблизительно 10^{-7} М, таким как, без ограничений, 1-9,9 (или в любом входящем в него диапазоне или значении, таком как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9) $\times 10^{-8}$М, 10^{-9}М, 10^{-10}М, 10^{-11}М, 10^{-12}М, 10^{-13}М, 10^{-14}М, 10^{-15}М или любой входящий в него диапазон или значение согласно определению методом поверхностного плазмонного резонанса или методом Kinexa, как практикуется специалистами в данной области. В одном примере аффинность равна или менее 1×10^{-8} М. В другом примере аффинность равна или менее 1×10^{-9} М.

Способы тестирования антител на способность связываться с любым функциональным участком CAR по изобретению известны в данной области техники и включают любой анализ связывания антитело-антиген, такой как, например, радиоиммуноанализ (РИА), вестерн-блоттинг, иммуноферментный анализ (ИФА), иммунопреципитация и анализы конкурентного ингибирования.

Часть CAR, содержащая антитело или его фрагмент антитела, может существовать

в различных формах, где антигенсвязывающий домен экспрессируется как участок непрерывной полипептидной цепи, включая, например, однодоменный фрагмент антитела (sdAb), scFv и химерное или гуманизированное антитело человека (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). В одном аспекте антигенсвязывающий домен CAR по изобретению содержит фрагмент антитела. В одном варианте осуществления CAR по изобретению содержит фрагмент антитела, который содержит scFv.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает hK2.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий

внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2;

трансмембранный домен; и

внутриклеточный сигнальный домен, необязательно содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно включает шарнирную область CD8a.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM) и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующий домен, содержащий компонент члена 9 суперсемейства TNF-рецепторов (CD137) и первичный сигнальный домен, содержащий компонент дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит

шарнирную область CD8a, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 25;

трансмембранный домен, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 26; и/или

внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующий домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 27, и первичный сигнальный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 28.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает hK2 и содержит:

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 138 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 137;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 163 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH

SEQ ID NO: 161;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 138 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 137;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 165 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 164;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 167 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 166;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 169 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 168;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 205 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 204;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 444 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 166;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 160 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 159;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 140 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 161;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 140 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 139;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 140 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 159;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 1 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 4;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 2 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 4;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 3 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 4;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 1 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 5;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 2 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 5;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 3 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 5;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 1 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 6;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 2 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 6; или

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 3 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 6.

В конкретном варианте осуществления изобретения предложен CAR, содержащий

внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает hK2 и содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 163 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 162.

В конкретном варианте осуществления изобретения предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связвает hK2 и содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 138 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 137; или LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 140 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 139.

В некоторых вариантах осуществления CDR определяются по Кэботу.

В некоторых вариантах осуществления CDR определяются по Чотиа.

В некоторых вариантах осуществления CDR определяются по IMGT.

В некоторых вариантах осуществления CDR определяются по AbM.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 63, 72, 141, 147, 170, 176, 188, 194, 196, 198, 200, 206 или 216, HCDR2 SEQ ID NO: 64, 65, 73, 142, 148, 171, 177, 183, 189, 195, 197, 199, 201, 207 или 217, HCDR3 SEQ ID NO: 66, 143, 172, 178, 184, 190, 208 или 218, LCDR1 SEQ ID NO: 67, 68, 144, 173, 179, 182, 185 или 191, LCDR2 SEQ ID NO: 69, 70, 145, 174, 180, 186, 192 или 470 и LCDR3 SEQ ID NO: 71, 146, 175, 181, 187, 193 или 209.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 63, 72, 141, 147, 170, 176, 188, 194, 196, 198, 200, 206 или 216, или их консервативные замены.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR2 SEQ ID NO: 64, 65, 73, 142, 148, 171, 177, 183, 189, 195, 197, 199, 201, 207 или 217, или их консервативные замены.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR3 SEQ ID NO: 66, 143, 172, 178, 184, 190, 208 или 218, или их консервативные замены.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен,

который связывает hK2, содержит LCDR1 SEQ ID NO: 67, 68, 144, 173, 179, 185, 191,или их консервативные замены.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит LCDR2 SEQ ID NO: 69, 70, 145, 174, 180, 186, 192 или 470, или их консервативные замены.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит LCDR3 SEQ ID NO: 71, 146, 175, 181, 187, 193, или 209, или их консервативные замены.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174, и 175, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186 и 187, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен,

который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470 и 209, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 180 и 181, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186 и 187, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192, и 193, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 216, 217, 218, 182, 470 и 209, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен,

который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 72, 73, 66, 67, 69 и 71, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 64, 66, 67, 69 и 71, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 68, 70 и 71, соответственно.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 72, 73, 66, 68, 70 и 71, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VL SEQ ID NO: 1, 2, 3, 138, 140, 160, 163, 165, 167, 169 или 205.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 4, 5, 6, 137, 139, 159, 161, 162, 164, 166, 168 или 204.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VL SEQ ID NO: 1, 2, 3, 138, 140, 160, 163, 165, 167, 169, 205 или 444 и VL SEQ ID NO: 4, 5, 6, 137, 139, 159, 161, 162, 164, 166, 168 или 204.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен, который связывает hK2, содержит

VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3;

VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140; или
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 160

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 138, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 137.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 163, и VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере, на 85%, 91%, 92%, 90%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 162.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL SEQ ID NO: 163, и VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере, на 85%, 91%, 92%, 90%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 162.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 163 и VH SEQ ID NO: 162.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 165, и VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 164.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 167, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 166.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 168, и VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 169.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 204, и VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере, на 85%, 91%, 92%, 90%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 160, и VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 159.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 140, и VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по

меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 161.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 140, и VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 139.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 140, и VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 91%, 92%, 90%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 159.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 1, и VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 1, и VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 1 и VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%

или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 2, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 2, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 2, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 3, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 3, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 3, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична полипептиду SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный

антигенсвязывающий домен, включающий VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138 или SEQ ID NO: 140, и VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137 или SEQ ID NO: 139.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит линкерный полипептид между VL и VH.

В некоторых вариантах осуществления линкерный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления линкерный полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 149, 150, 151, 152, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424 или 425.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен,

который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 410.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 411.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 412.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 413.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 414.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 415.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 416.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 417.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 418.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 419.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 420.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 421.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 422.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 423.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 424.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 425.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например*, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 416 или SEQ ID NO: 417.

В конкретном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 416 или SEQ ID NO: 417

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, включающий scFv, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например*, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151 или SEQ ID NO: 152

В конкретном варианте осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, включающий scFv, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151 или SEQ ID NO: 152.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей

мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей

мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 133.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 134.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 135.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 136.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 318.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 319.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 320.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей

мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 321.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 322.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 323.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 404.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 405.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 322.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 323.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 404.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 405.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 406.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей

мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 407.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 408.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 409.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 324.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 325.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 308.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 316.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 404.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 405.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 404 или SEQ ID NO: 405.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ

ID NO: 135 или SEQ ID NO: 136.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 134.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 135.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 136.

В конкретном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135 или SEQ ID NO: 136.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит сигнальный полипептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 149, 150, 151, 152, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422. 423, 424 или 425.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен,

который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен,

который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен,

который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43.

В изобретении также предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента члена 9 суперсемейства рецепторов ФНО (CD137), компонента дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток, компонента кластера дифференцировки (CD27), члена суперсемейства дифференцировки (такого как, например, CD28 или компонента индуцируемого Т-клеточного костимулятора (ICOS)) и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах осуществления компонент CD3z содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45.

SEQ ID NO: 45

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM). В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 26**. (IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC; **SEQ ID NO: 26**).

В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает по меньшей мере трансмембранную(-ые) область(-и) α-, β- или ζ-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD40, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит по меньшей мере трансмембранный домен из ζ, η или FcεR1γ и -β, MB1 (Igα.), B29 или CD3-γ, ζ или η. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен является синтетическим, например, содержащим преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин, триплет фенилаланина или триптофана.

В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит шарнирную область, связывающую трансмембранный домен с внеклеточным антигенсвязывающим доменом, который связывает hK2. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область представляет собой шарнирную область CD8a. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 25** (TSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD; SEQ ID NO: 25).

В некоторых вариантах осуществления шарнирная область CD8a содержит

аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: **25**. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO: 126**) или содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 126). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит последовательность ERKCCVECPPCP (**SEQ ID NO: 127**) или содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO: 127). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит последовательность ELKTPLGDTTHTCPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)$_3$, (SEQ ID NO: 128 или содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ELKTPLGDTTHTCPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)$_3$ (SEQ ID NO: 128). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит последовательность ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 129) или содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 129).

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 153, 154, 155, 156, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 435, 436, 437, 438, 439, 440 или 441.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по

меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 55.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 57.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 60.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 61.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 154.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 155.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 156.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 426.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 426.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 427.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по

меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 427.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 428.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:428.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 429.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 429.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 430.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 430.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 431.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 431.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 432.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 432.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 433.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 433.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 434.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 434.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 435.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 435.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 436.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 436.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 437.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 437.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 438.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 438.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 439.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 439.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 440.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 440.

В настоящем описании также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 441.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 441.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 432.

В изобретении также предложен CAR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 433.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 432 или SEQ ID NO: 433.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155 или SEQ ID NO: 156.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 154.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 155.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 156.

В конкретном варианте CAR содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155 или SEQ ID NO: 156

В конкретном варианте осуществления предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, связывающий hK2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен,

связывается с hK2 в трех или более остатках в пределах эпитопов, имеющих последовательности SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 112.

Конструкции CAR и иммунореактивные клетки, экспрессирующие CAR

В изобретении также предложены выделенные полинуклеотиды, кодирующие CAR, описанные в настоящем документе.

Если не указано иное, «полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность», включает в себя все полинуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза «полинуклеотид, который кодирует белок или РНК» также может включать в себя интроны в той мере, что полинуклеотид, кодирующий белок, может в некоторых версиях содержать интрон(-ы), который(-ые) сплайсируется(-ются) в экспрессированный белок.

В изобретении также предложен вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует CAR по изобретению.

Термин «экспрессионный вектор» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, который содержит регулирующие экспрессию последовательности, функционально соединенные с нуклеотидной последовательностью, которая подлежит экспрессии. Экспрессионный вектор содержит достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут обеспечиваться клеткой-хозяином или в системе экспрессии in vitro. Экспрессионные векторы включают все известные в данной области техники векторы, включая космиды, плазмиды (например, «голые» или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы), которые содержат рекомбинантный полинуклеотид.

В настоящем описании также предложены выделенные иммунореактивные клетки, содержащие CAR по изобретению. В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка трансдуцируется CAR, например, CAR конститутивно экспрессируется на поверхности иммунореактивной клетки. В определенных вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка дополнительно трансдуцируется по меньшей мере одним костимулирующим лигандом, так что иммунореактивная клетка экспрессирует по меньшей мере один костимулирующий лиганд. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один костимулирующий лиганд выбран из группы, состоящей из 4-1BBL, CD48, CD70, CD80, CD86, OX40L, TNFRSF14 и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка дополнительно трансдуцируется по меньшей мере одним цитокином, так что иммунореактивная клетка секретирует по меньшей мере один цитокин. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере цитокин выбран из группы, состоящей из ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-17, ИЛ-21 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-лимфоцита (Т-клетки), природной клетки-киллера (NK),

цитотоксического Т-лимфоцита (CTL), регуляторной Т-клетки (Treg), эмбриональной стволовой клетки человека, лимфоидной клетки-предшественника, клетки-предшественника Т-клетки и плюрипотентной стволовой клетки, из которой могут быть дифференцированы лимфоидные клетки.

В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунологическая клетка представляет собой Т-клетку.

Для целей данного изобретения Т-клетка может быть любой Т-клеткой, такой как культивируемая Т-клетка, например, первичная Т-клетка, или Т-клетка из культивируемой линии Т-клеток, например, Jurkat, SupT1 и т. д., или Т-клетка, полученная от млекопитающего. Если Т-клетка получена от млекопитающего, она может быть получена из множества источников, включая, помимо прочего, костный мозг, кровь, лимфатический узел, тимус или другие ткани или жидкости. Т-клетки также могут быть обогащенными или очищенными. Т-клетка может представлять собой Т-клетку человека. Т-клетка может представлять собой Т-клетку, выделенную из человека. Т-клетка может быть Т-клеткой любого типа и любой стадии развития, включая, помимо прочего, $CD4^+/CD8^+$ дважды положительные Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), $CD4^+$ Т-хелперы, например, Th1 и Th2-клетки, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), лейкоциты периферической крови (ЛПК), инфильтрирующие опухоль клетки, Т-клетки памяти, наивные Т-клетки и т. п. Т-клетка может представлять собой $CD8^+$ Т-клетку или $CD4^+$ Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунологическая клетка представляет собой NK-клетку.

В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунологическая клетка представляет собой CTL.

В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунологическая клетка представляет собой Treg.

В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунологическая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку человека.

В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунологическая клетка представляет собой лимфоидную клетку-предшественника.

В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунологическая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку.

В одном варианте осуществления CAR-Т-клетки по настоящему изобретению могут быть получены путем введения лентивирусного вектора, содержащего желаемый CAR, например, CAR, содержащий внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, шарнирную область CD8α и трансмембранный домен, а также сигнальные домены 4-1BB и CD3-дзета человека, в клетки. CAR Т-клетки по изобретению способны реплицироваться in vivo, что приводит к длительной стойкости, что может привести к устойчивому контролю над опухолью.

В вариантах осуществления изобретения дополнительно предложены клетки-

хозяева, содержащие любой из рекомбинантных векторов экспрессии, описанных в данном документе. Используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» относится к любому типу клеток, которые могут содержать рекомбинантный экспрессионный вектор. Клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку, например, растения, животного, водоросли или гриба, или может представлять собой прокариотическую клетку, например, бактерии или простейшего. Клетка-хозяин может представлять собой культивируемую клетку или первичную клетку, т. е. выделенную непосредственно из организма, например, человека. Клетка-хозяин может представлять собой адгезивную клетку или суспендированную клетку, т. е. клетку, которая растет в суспензии. Подходящие клетки-хозяева известны в данной области техники и включают, например, клетки E. coli DH5α, клетки яичника китайского хомячка, клетки обезьяны, клетки COS, клетки HEK293 и т. п. Для целей амплификации или репликации рекомбинантного вектора экспрессии клетка-хозяин может быть прокариотической клеткой, например, клеткой DH5α. Для получения рекомбинантного CAR, полипептида или белка клетка-хозяин может представлять собой клетку млекопитающего. Клетка-хозяин может представлять собой человеческую клетку. Хотя клетка-хозяин может относиться к любому типу клеток, может происходить из ткани любого типа и может быть на любой стадии развития, клетка-хозяин может представлять собой лимфоцит периферической крови (PBL). Клетка-хозяин может представлять собой Т-клетку.

Также предложена популяция клеток, содержащая по меньшей мере одну клетку-хозяина, описанную в данном документе. Популяция клеток может представлять собой гетерогенную популяцию, включающую клетку-хозяин, содержащую любой из описанных рекомбинантных векторов экспрессии, в дополнение по меньшей мере к одной другой клетке, например, клетке-хозяину (например, Т-клетке), которая не содержит ни одного из рекомбинантных векторов экспрессии или клетки, отличной от Т-клетки, например, В-клетки, макрофага, эритроцита, нейтрофила, гепатоцита, эндотелиальной клетки, эпителиальной клетки, мышечной клетки, клетки мозга и т. д. Альтернативно, популяция клеток может быть по существу гомогенной популяцией, в которой популяция в основном содержит клетки-хозяева (например, состоящие в основном из), содержащие рекомбинантный экспрессионый вектор. Популяция также может быть клональной популяцией клеток, в которой все клетки популяции являются клонами одной клетки-хозяина, содержащей рекомбинантный экспрессионный вектор, так что все клетки популяции содержат рекомбинантный экспрессионный вектор. В одном варианте осуществления популяция клеток представляет собой клональную популяцию, содержащую клетки-хозяева, содержащие рекомбинантный экспрессионный вектор, как описано в данном документе.

Полинуклеотиды, клетки-хозяева и векторы

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий любой белок, связывающий hK2 по изобретению. Белок, связывающий hK2, включает антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2, белки, содержащие

антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2, мультиспецифические белки, которые содержат антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2 и химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2 по изобретению.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий любой белок, связывающий hK2, или его фрагменты.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH SEQ ID NO: 137.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH SEQ ID NO: 162.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH SEQ ID NO: 164.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH SEQ ID NO: 166.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH SEQ ID NO: 168.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH SEQ ID NO: 204.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH SEQ ID NO: 159.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH SEQ ID NO: 161.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH SEQ ID NO: 139.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 4, 5 или 6.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH SEQ ID NO: 75.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 138.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 163.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 165.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 167.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 169.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 205.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 140.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 160.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 74.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL с SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий

VH с SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138;

VH с SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163;

VH с SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165;

VH с SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167;

VH с SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169;

VH с SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205;

VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160;

VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140;

VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140;

VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1;

VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2;

VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3;

VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1;

VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3;

VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1;

VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2; или

VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH SEQ ID NO: 162 и/или выделенный полинуклеотид, кодирующий VL SEQ ID NO: 163.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 133, 134, 135, 136, 308, 316, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 404, 405, 406, 407, 408 или 409.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 149, 150, 151, 152, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422. 423, 424 или 425.

В некоторых вариантах осуществления выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая hK2-связывающий белок по изобретению, по меньшей мере на 85% идентична полинуклеотиду SEQ ID NO: 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 263, 271, 273, 274,

275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 303, 304, 305, 306, 312, 316, 317, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 446, 450 или 451.

В некоторых вариантах осуществления выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая hK2-связывающий белок по изобретению, по меньшей мере на 90% идентична полинуклеотиду SEQ ID NO: 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 263, 271, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 303, 304, 305, 306, 312, 316, 317, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 446, 450 или 451.

В некоторых вариантах осуществления выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая hK2-связывающий белок по изобретению, по меньшей мере на 95% идентична полинуклеотиду SEQ ID NO: 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 263, 271, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 303, 304, 305, 306, 312, 316, 317, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 446, 450 или 451.

В некоторых вариантах осуществления выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая hK2-связывающий белок по изобретению, по меньшей мере на 98% идентична полинуклеотиду SEQ ID NO: 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 263, 271, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 303, 304, 305, 306, 312, 316, 317, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 446, 450 или 451.

В некоторых вариантах осуществления выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая hK2-связывающий белок по изобретению, по меньшей мере на 99% идентична полинуклеотиду SEQ ID NO: 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 263, 271, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 303, 304, 305, 306, 312, 316, 317, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 446, 450 или 451.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид SEQ ID NO: 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 263, 267, 271, 267, 274, 282, 292, 293, 294, 295, 303, 304, 305, 306,312, 316, 363, 364, 365, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373 или 374.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид SEQ ID NO: 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 263, 271, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 303, 304, 305, 306, 312, 316, 317, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 446, 450 или 451. В конкретном варианте осуществления изобретения предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептидную последовательность SEQ ID NO: 354.

В конкретном варианте осуществления предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептидную последовательность SEQ ID NO: 221.

В конкретном варианте осуществления предложена выделенная полинуклеотидная

последовательность, кодирующая полипептидную последовательность SEQ ID NO: 360.

В конкретном варианте осуществления изобретения предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептидную последовательность SEQ ID NO: 354, 221 и 360.

В конкретном варианте осуществления изобретения предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична полинуклеотиду SEQ ID NO: 367.

В конкретном варианте осуществления изобретения предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична полинуклеотиду SEQ ID NO: 303.

В конкретном варианте осуществления изобретения предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична полинуклеотиду SEQ ID NO: 373.

В конкретном варианте осуществления предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептидную последовательность SEQ ID NO: 361.

В конкретном варианте осуществления предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептидную последовательность SEQ ID NO: 221.

В конкретном варианте осуществления предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептидную последовательность SEQ ID NO: 362. В конкретном варианте осуществления изобретения предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептидную последовательность SEQ ID NO: 361, 221 и 362.

В конкретном варианте осуществления изобретения предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична полинуклеотиду SEQ ID NO: 370.

В конкретном варианте осуществления изобретения предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична полинуклеотиду SEQ ID NO: 303.

В конкретном варианте осуществления изобретения предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична полинуклеотиду SEQ ID NO: 374.

В некоторых вариантах осуществления изобретения также предложена выделенная или очищенная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотид, который комплементарен полинуклеотидам, кодирующим hK2-связывающие белки по

изобретению, или полинуклеотидам, которые гибридизуются в жестких условиях с полинуклеотидами, кодирующими hK2-связывающие белки по изобретению.

Полинуклеотиды, которые гибридизируются в жестких условиях, могут гибридизироваться в условиях высокой жесткости. Под «условиями высокой жесткости» понимается, что полинуклеотид специфически гибридизируется с целевой последовательностью (нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе) в степени, обнаружимой сильнее, чем неспецифическая гибридизация. Условия высокой жесткости включают условия, которые позволяют различить полинуклеотид с точно комплементарной последовательностью или полинуклеотид, содержащий только несколько разбросанных несовпадений из случайной последовательности, которая имеет несколько небольших областей (например, 3-12 оснований), которые соответствуют нуклеотидной последовательности. Такие небольшие области комплементарности легче расплавляются, чем полноразмерный комплемент из 14-17 или более оснований, и гибридизация с высокой жесткостью делает их легко различимыми. Условия относительно высокой жесткости будут включать, например, условия с низким содержанием соли и/или высокой температурой, такие как обеспечиваемые около 0,02-0,1 M NaCl или его эквивалентом, при температурах примерно 50-70 °C. Такие условия высокой жесткости допускают небольшое несоответствие между нуклеотидной последовательностью и матрицей или целевой цепью, если таковое имеется, или особенно подходят для обнаружения экспрессии любого из CAR, описанных в данном документе. Как правило, считается, что условия можно сделать более жесткими путем добавления возрастающих количеств формамида.

Полинуклеотидные последовательности по изобретению могут быть функционально связаны с одним или более регуляторными элементами, такими как промотор или энхансер, которые позволяют экспрессировать нуклеотидную последовательность в предполагаемой клетке-хозяине. Полинуклеотид может представлять собой кДНК. Промотор может представлять собой сильный, слабый, специфичный к ткани, индуцибельный или специфичный к развитию промотор. Примеры промоторов, которые можно использовать, включают гипоксантинфосфорибозилтрансферазу (HPRT), аденозиндеаминазу, пируваткиназу, бета-актин, человеческий миозин, гемоглобин человека, креатин мышц человека и др. Кроме того, многие вирусные промоторы функционируют конститутивно в эукариотических клетках и являются приемлемыми для применения в описанных вариантах осуществления. К таким вирусным промоторам относятся немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), ранний и поздний промоторы SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Малони, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса Эпштейна-Барр (EBV), вируса саркомы Рауса (RSV) и других ретровирусов и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. Также можно использовать индуцибельные промоторы, такие как промотор металлотионеина, индуцируемый тетрациклином промотор, индуцируемый

доксициклином промотор, промоторы, которые содержат один или более интерферон-стимулируемых реагирующих элементов (ISRE), такие как протеинкиназа R 2',5'-олигоаденилатсинтетазы, гены Mx, ADAR1 и т. п.

В настоящем изобретении также предложен вектор, содержащий полинуклеотид настоящего изобретения. В настоящем изобретении также предложен экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид настоящего изобретения. Такие векторы могут представлять собой плазмидные векторы, вирусные векторы, векторы для экспрессии бакуловирусов, векторы на основе транспозонов или любые другие векторы, приемлемые для введения синтетического полинуклеотида настоящего изобретения в данный организм или в данное генетическое окружение любым способом. Полинуклеотиды, кодирующие hK2-связывающие белки по изобретению, могут быть функционально связаны с контрольными последовательностями в экспрессионном(-ых) векторе(-ах), который(-ые) обеспечивает(-ют) экспрессию hK2-связывающих белков. К таким регуляторным элементам могут относиться промотор транскрипции, последовательности, кодирующие приемлемые участки связывания мРНК с рибосомой, и последовательности, контролирующие терминацию транскрипции и трансляции. Экспрессионные векторы также могут включать в себя один или более нетранскрибируемых элементов, например точку начала репликации, приемлемый промотор и энхансер, связанные с экспрессируемым геном, другие 5' или 3' фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, 5' или 3' нетранслируемые последовательности (например, необходимые участки связывания с рибосомой), сайт полиаденилирования, донорный и акцепторный сайты сплайсинга или последовательности терминации транскрипции. Кроме того, может быть встроена точка начала репликации, обеспечивающая способность к репликации в клетке-хозяине.

Экспрессионные векторы могут содержать межнуклеотидные связи природного происхождения или неприродного происхождения или оба типа связей. Неприродные или измененные нуклеотиды или межнуклеотидные связи не препятствуют транскрипции или репликации вектора.

После введения вектора в соответствующего хозяина проводят инкубацию хозяина в условиях, приемлемых для высокоуровневой экспрессии hK2-связывающих белков по изобретению, кодируемых введенными полинуклеотидами. Последовательности контроля транскрипции и трансляции в экспрессионных векторах, предназначенных для трансформации клеток позвоночных, могут быть получены из вирусных источников. Примеры векторов, которые можно сконструировать, описаны в публикации Okayama and Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983).

Векторы по изобретению также могут содержать один или более участков внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение последовательности IRES в слитые векторы может быть полезно для усиления экспрессии некоторых белков. В некоторых вариантах осуществления векторная система может включать в себя один или более участков полиаденилирования (например, SV40), которые могут находиться выше или

ниже любой из вышеупомянутых последовательностей нуклеиновых кислот. Компоненты вектора могут быть сшиты друг с другом или расположены так, чтобы обеспечить оптимальное разнесение в пространстве для экспрессии генных продуктов (т. е. путем введения «спейсерных» нуклеотидов между открытыми рамками считывания (ORF)), или расположены другим способом. Регуляторные элементы, такие как мотив IRES, также могут быть расположены с возможностью обеспечения оптимального разнесения в пространстве для экспрессии.

Векторы в соответствии с настоящим описанием могут быть кольцевым или линейными. Они могут быть получены с возможностью наличия системы репликации, функционирующей в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации могут быть получены, например, из ColE1, SV40, 2μ плазмиды, λ, вируса бычьей папилломы и т. п.

Рекомбинантные векторы экспрессии могут быть разработаны либо для транзиентной экспрессии, либо для стабильной экспрессии, либо для обоих типов. Кроме того, рекомбинантные векторы экспрессии могут быть получены для конститутивной экспрессии или для индуцируемой экспрессии.

Дополнительно могут быть созданы рекомбинантные векторы экспрессии, включающие суицидальный ген. Используемый в данном документе термин «суицидальный ген» относится к гену, который заставляет клетку, экспрессирующую суицидальный ген, погибать. Суицидальный ген может быть геном, который придает чувствительность к агенту, например, лекарственному средству, клетке, в которой экспрессируется ген, и заставляет клетку погибать, когда клетку приводят в контакт с агентом или она подвергается его воздействию. Гены-самоубийцы известны в данной области и включают, например, ген тимидинкиназы (TK) вируса простого герпеса (HSV), цитозиндезаминазу, пурин-нуклеозидфосфорилазу и нитроредуктазу.

Векторы могут также содержать селективные маркеры, хорошо известные в данной области. Селективные маркеры включают в себя маркер положительной и отрицательной селекции. Маркерные гены включают гены резистентности к биоцидам, например, гены резистентности к антибиотикам, тяжелым металлам и т.д., комплементации в ауксотрофном хозяине для обеспечения прототрофности и т.п. Примеры маркерных генов включают в себя гены резистентности к антибиотикам (например, ген резистентности к неомицину, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к канамицину, ген резистентности к тетрациклину, ген резистентности к пенициллину, ген резистентности к гистидинолу, ген резистентности к гистидинолу x), гены глутамин синтазы, HSV-TK, производные HSV-TK для ганцикловирной селекции или ген бактериальной пуриннуклеозидфосфорилазы для селекции по 6-метилпурину (Gadi et al., 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000)). Нуклеотидная последовательность, кодирующая селективный маркер или сайт клонирования, может располагаться выше или ниже нуклеотидной последовательности, кодирующей интересующий полипептид или сайт клонирования.

Примерами векторов, которые могут применяться, являются бактериальные: pBs,

phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, Ла-Холья, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 и pRIT5 (Pharmacia, г. Уппсала, Швеция). Эукариотические: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL (Pharmacia), pEE6.4 (Lonza) и pEE12.4 (Lonza). Дополнительные векторы включают серию pUC (Fermentas Life Sciences, Глен Берни, штат Мэриленд, США), серию pBluescript (Stratagene, г. Ла-Холья, штат Калифорния, США), серию pET (Novagen, г. Мэдисон, штат Висконсин, США), серию pGEX (Pharmacia Biotech, г. Уппсала, Швеция) и серию pEX (Clontech, г. Пало-Альто, штат Калифорния, США). Можно использовать векторы бактериофагов, такие как λGT10, λGT11, λEMBL4 и λNM1149, λZapII (Stratagene). Примеры векторов экспрессии растений включают pBI01, pBI01.2, pBI121, pBI101.3 и pBIN19 (Clontech). Примеры векторов экспрессии на животных включают pEUK-Cl, pMAM и pMAMneo (Clontech). Экспрессионный вектор может быть вирусным вектором, например, ретровирусным вектором, например, гамма-ретровирусным вектором.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 137.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 162.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 164.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 166.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 168.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 204.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 159.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 161.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 139.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH SEQ ID NO: 4, 5 или 6.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 138.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 165.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 167.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 169.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 160.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий

VH с SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138;
VH с SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163;
VH с SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165;
VH с SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167;
VH с SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169;
VH с SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2; или
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий SEQ ID NO: SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 133, 134, 135, 136, 308, 316, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 404, 405, 406, 407, 408 или 409.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид,

кодирующий полипептид SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 149, 150, 151, 152, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422. 423, 424 или 425.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 354. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 221. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 360. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен вектор полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 354, 221 и 360.

В конкретном варианте осуществления вектор содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 367. В конкретном варианте осуществления вектор содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 303. В конкретном варианте осуществления вектор содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 373. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 367, 303 и 373.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 361. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 221. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 362.

В конкретном варианте осуществления вектор содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 370. В конкретном варианте осуществления вектор содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 303. В конкретном варианте осуществления вектор содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 374.

В изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая один или более векторов по изобретению. Термин «клетка-хозяин» относится к клетке, в которую был встроен вектор. Следует понимать, что термин «клетка-хозяин» служит для обозначения не только конкретной заявленной клетки, но и потомства такой клетки, а также стабильной клеточной линии, полученной из конкретной заявленной клетки. Так как в последующих поколениях могут возникать некоторые модификации вследствие либо мутации, либо воздействий среды, такое потомство может быть неидентичным исходной клетке, но оно также может быть охвачено термином «клетка-хозяин», используемым в настоящем документе. Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические, прокариотические, растительные клетки или клетки архей. Кишечная палочка (Escherichia coli), бациллы, такие как сенная палочка (Bacillus subtilis), и другие энтеробактерии, такие как сальмонеллы, серратия и различные виды псевдомонад, являются примерами прокариотических клеток-хозяев. Для экспрессии также можно использовать другие микроорганизмы, такие как дрожжи. Сахаромицеты (например, S. cerevisiae) и пихии являются примерами приемлемых дрожжевых клеток-хозяев. Примерами

эукариотических клеток могут быть клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают иммортализованные клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например мышиные клеточные линии SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580). Примером клеточной линии миеломы человека является U266 (ATTC CRL-TIB-196). Другие используемые клеточные линии включают в себя линии, полученные из клеток яичника китайского хомячка (CHO), например CHO-K1SV (Lonza Biologics, г. Уолкерсвилл, штат Мэриленд, США), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

В изобретении также предложен способ получения hK2-связывающего белка по изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях экспрессии hK2-связывающего белка и выделение hK2-связывающего белка, продуцируемого клеткой-хозяином. Известны способы получения белков и их очистки. После синтеза (химического или рекомбинантного) hK2-связывающие белки можно очищать в соответствии со стандартными процедурами, включающими в себя осаждение сульфатом аммония, применение аффинных колонок, колоночную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), гель-электрофорез и т. п. (см. по существу Scopes, Protein Purification (Springer- Verlag, N.Y., (1982)). Заявленный белок может быть по существу чистым, например чистым на по меньшей мере от около 80% до 85%, чистым на по меньшей мере от около 85% до 90%, чистым на по меньшей мере от около 90% до 95%, чистым на по меньшей мере от около 98% до 99% или более, например не содержащим загрязнителей, таких как клеточный дебрис, макромолекулы и т. д., отличных от заявленного антитела.

Полинуклеотиды, кодирующие hK2-связывающие белки по изобретению, могут быть включены в векторы с применением стандартных способов молекулярной биологии. Трансформацию клетки-хозяина, культивирование, экспрессию и очистку антитела выполняют с применением хорошо известных способов.

Для получения полинуклеотидов по настоящему изобретению можно использовать модифицированные нуклеотиды. Примеры модифицированных нуклеотидов включают 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил) урацил, карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, N^6-замещенный аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеуозин, 5″-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N^6-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), вибутоксизин, псевдоурацил, квеуозин, бета-D-галактозилквеозин, инозин, N^6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метинозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-

метилурацил, метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил) урацил и 2,6-диаминопурин.

Фармацевтические композиции/введение

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая hK2-связывающий белок по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2 по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая белок, включающий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифический белок, включающий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая CAR, включающий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Для терапевтического применения возможна подготовка hK2-связывающего белка по изобретению в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество антитела в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или несущей среде, с которыми вводят антитело настоящего изобретения. Такие несущие среды могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Например, можно применять 0,4%-й солевой раствор и 0,3%-й раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Стерилизацию проводят с использованием стандартных, хорошо известных способов стерилизации (например, фильтрования). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH и буферные агенты, стабилизирующие, загущающие, увлажняющие и окрашивающие агенты и т. д. Концентрация антител по изобретению в таком фармацевтическом составе может варьировать от менее около 0,5%, обычно по меньшей мере около 1% и до 15 или 20% вес., и может выбираться преимущественно на основании необходимой дозы, объемов текучей среды, значений вязкости и т. д. в соответствии с выбранным способом введения. Приемлемые несущие среды и составы, включающие другие человеческие белки, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical

Manufacturing pp 691-1092, см., в особенности pp. 958-989.

Способом введения hK2-связывающего белка по изобретению может быть любой приемлемый путь, такой как парентеральное введение, например внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное или подкожное, трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное) или другие способы, известные специалисту, как хорошо известно в данной области.

В вариантах осуществления настоящего изобретения клетки, экспрессирующие CAR, могут быть представлены в композициях, например, подходящей фармацевтической композиции(-ях), содержащей клетки, экспрессирующие CAR, и фармацевтически приемлемый носитель. В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие эффективное количество лимфоцитов, экспрессирующих один или более из описанных CAR, и фармацевтически приемлемый эксципиент. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать экспрессирующую CAR клетку, например, множество экспрессирующих CAR клеток, как описано в данном документе, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или разбавителями. Фармацевтически приемлемый носитель может быть ингредиентом фармацевтической композиции, отличным от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта.

Фармацевтически приемлемый носитель может включать буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант. Примерами фармацевтически приемлемых носителей являются растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и т. п., которые обладают физиологической совместимостью, такие как соли, буферы, антиоксиданты, сахариды, водные или неводные носители, консерванты, смачивающие агенты, поверхностно-активные вещества или эмульгирующие агенты или их комбинации. Количества фармацевтически приемлемого(-ых) носителя(-ей) в фармацевтических композициях могут быть определены экспериментально на основании активности носителя(-ей) и желаемых характеристик состава, таких как стабильность и/или минимальное окисление. Термин «фармацевтически приемлемый», используемый в настоящем документе применительно к фармацевтическим композициям, означает, что они были одобрены регуляторным органом федерального правительства или правительства штата или включены в Фармакопею США или другую общепризнаную фармакопею для применения на животных и/или на людях.

Способ лечения и способы применения

В изобретении также предложен способ лечения рака, экспрессирующего hK2, у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего домена, который связывает hK2 по изобретению, в течение времени, достаточного для лечения рака, экспрессирующего hK2.

В изобретении также предложен способ лечения рака, экспрессирующего hK2, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества белка,

содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, в течение времени, достаточного для лечения рака, экспрессирующего hK2

В изобретении также предложен способ лечения рака, экспрессирующего hK2, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, в течение времени, достаточного для лечения рака, экспрессирующего hK2.

В изобретении также предложен способ лечения рака, экспрессирующего hK2, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, в течение времени, достаточного для лечения рака, экспрессирующего hK2.

В изобретении также предложен способ лечения рака, экспрессирующего hK2, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, в течение времени, достаточного для лечения рака, экспрессирующего hK2.

В изобретении также предложен способ лечения рака, экспрессирующего hK2, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, в течение времени, достаточного для лечения рака, экспрессирующего hK2.

В изобретении также предложен способ введения генетически модифицированной Т-клетки, экспрессирующей CAR, для лечения субъекта, страдающего раком или подверженного риску заболеть раком, с использованием инфузии лимфоцитов.

По меньшей мере, в одном варианте осуществления в лечении используется инфузия аутологичных лимфоцитов. Аутологичные МКПК собирают у субъекта, нуждающегося в лечении, и Т-клетки активируют и размножают с использованием способов, описанных в данном документе и известных в данной области техники, а затем снова вводят субъекту.

В одном аспекте изобретение относится по существу к лечению субъекта, подверженного риску развития рака. Изобретение также включает лечение злокачественного образования или аутоиммунного заболевания, при котором химиотерапия и/или иммунотерапия приводит к значительной иммуносупрессии, тем самым повышая риск развития рака у субъекта.

В изобретении также предложен способ лечения неракового состояния у субъекта, подверженного риску развития ракового состояния, включающий введение субъекту антигенсвязывающего домена, который связывает hK2 по изобретению, для лечения неракового состояния.

В изобретении также предложен способ лечения неракового состояния у субъекта, подверженного риску развития ракового состояния, включающий введение белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению,

субъекту для лечения неракового состояния.

В изобретении также предложен способ лечения неракового состояния у субъекта, подверженного риску развития ракового состояния, включающий введение мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, субъекту для лечения неракового состояния.

В изобретении также предложен способ лечения неракового состояния у субъекта, подверженного риску развития ракового состояния, включающий введение иммуноконъюгата по изобретению субъекту для лечения неракового состояния.

В изобретении также предложен способ лечения неракового состояния у субъекта, подверженного риску развития ракового состояния, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению для лечения неракового состояния.

В изобретении также предложен способ лечения неракового состояния у субъекта, подверженного риску развития ракового состояния, включающий введение субъекту CAR по изобретению для лечения неракового состояния.

В некоторых вариантах осуществления субъект, подверженный риску развития ракового состояния, имеет увеличенную предстательную железу.

В некоторых вариантах осуществления субъект, подверженный риску развития ракового состояния, имеет доброкачественную гиперплазию предстательной железы (ДГПЖ).

В некоторых вариантах осуществления субъект, подверженный риску развития ракового состояния, имеет высокий уровень ПСА при отсутствии диагностированного рака предстательной железы.

В изобретении также предложен способ профилактики рака, экспрессирующего hK2, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего домена, который связывает hK2 по изобретению, в течение времени, достаточного для профилактики рака, экспрессирующего hK2.

В изобретении также предложен способ профилактики рака, экспрессирующего hK2, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, в течение времени, достаточного для профилактики рака, экспрессирующего hK2

В изобретении также предложен способ профилактики рака, экспрессирующего hK2, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, в течение времени, достаточного для профилактики рака, экспрессирующего hK2.

В изобретении также предложен способ профилактики рака, экспрессирующего hK2, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, в течение времени, достаточного для профилактики рака, экспрессирующего hK2.

В изобретении также предложен способ профилактики рака, экспрессирующего

hK2, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, в течение времени, достаточного для профилактики рака, экспрессирующего hK2.

В изобретении также предложен способ профилактики рака, экспрессирующего hK2, у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, в течение времени, достаточного для профилактики рака, экспрессирующего hK2.

В изобретении также предложен способ снижения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2, у субъекта, включающий введение субъекту антигенсвязывающего домена, который связывает hK2 по изобретению, в течение времени, достаточного для уменьшения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2.

В изобретении также предложен способ снижения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2, у субъекта, включающий введение белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, в течение времени, достаточного для уменьшения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2.

В изобретении также предложен способ снижения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2, у субъекта, включающий введение мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, субъекту в течение времени, достаточного для уменьшения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2.

В изобретении также предложен способ снижения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2, у субъекта, включающий введение CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по изобретению, субъекту в течение времени, достаточного для уменьшения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2.

В изобретении также предложен способ снижения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2, у субъекта, включающий введение иммуноконъюгата по изобретению субъекту в течение времени, достаточного для уменьшения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2.

В изобретении также предложен способ снижения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2, у субъекта, включающий введение фармацевтической композиции по изобретению субъекту в течение времени, достаточного для уменьшения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2.

В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий hK2, представляет собой рак предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий hK2, представляет собой рак, связанный с предстательной железой.

В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий hK2, имеет метастазы в костях.

В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий hK2, представляет собой рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления рак, экспрессирующий hK2, представляет собой рак молочной железы, экспрессирующий андрогенный рецептор (AR).

В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой рецидивирующий, рефрактерный, злокачественный или кастрационно-резистентный рак предстательной железы или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой рецидивирующий, рефрактерный или злокачественный рак молочной железы или любую их комбинацию.

В изобретении также предложен способ лечения рака предстательной железы у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака предстательной железы, причем антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит

VH с SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138;
VH с SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163;
VH с SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165;
VH с SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167;
VH с SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169;
VH с SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2; или
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3.

В изобретении также предложен способ лечения рака предстательной железы у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака предстательной железы, причем антигенсвязывающий домен, который связывает hK2,

содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 133, 134, 135, 136, 308, 316, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 404, 405, 406, 407, 408 или 409.

В изобретении также предложен способ лечения рака молочной железы у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака молочной железы, причем антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит

VH с SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138;
VH с SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163;
VH с SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165;
VH с SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167;
VH с SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169;
VH с SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205;
VH с SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160;
VH с SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2;
VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1;
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2; или
VH с SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3.

В изобретении также предложен способ лечения рака молочной железы у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака молочной железы, причем антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 133, 134, 135, 136, 308, 316, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 404, 405, 406, 407, 408 или 409.

В изобретении также предложен способ лечения рака предстательной железы у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака предстательной железы, причем антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит:

HCDR1 с SEQ ID NO: 116, HCDR2 SEQ ID NO: 117, HCDR3 SEQ ID NO: 118,

LCDR1 SEQ ID NO: 119, LCDR2 SEQ ID NO: 120 и LCDR3 SEQ ID NO: 121;

HCDR1 с SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259, и LCDR3 SEQ ID NO: 260; или

HCDR1 с SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261.

В изобретении также предложен способ лечения рака предстательной железы у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака предстательной железы, причем антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит:

VH с SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 249; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 250; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 252; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 253; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 254; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 157.

В изобретении также предложен способ лечения рака молочной железы у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака молочной железы, причем антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит:

HCDR1 с SEQ ID NO: 116, HCDR2 SEQ ID NO: 117, HCDR3 SEQ ID NO: 118, LCDR1 SEQ ID NO: 119, LCDR2 SEQ ID NO: 120 и LCDR3 SEQ ID NO: 121;

HCDR1 с SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259, и LCDR3 SEQ ID NO: 260; или

HCDR1 с SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261.

В изобретении также предложен способ лечения рака молочной железы у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака молочной железы, причем антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит:

VH с SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 249; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 250; или

VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251; или
VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 252; или
VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 253; или
VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 254; или
VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 157.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способы предотвращения рака, причем способы включают введение количества лимфоцитов, экспрессирующих один или более описанных CAR, нуждающимся в этом субъекту.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения субъекта, имеющего рак, включающие введение терапевтически эффективного количества лимфоцитов, экспрессирующих один или более описанных CAR, нуждающемуся в этом субъекту, в результате чего лимфоциты индуцируют или модулируют уничтожение раковых клеток у субъекта.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы уменьшения опухолевой нагрузки у субъекта, страдающего раком, при этом способы включают введение терапевтически эффективного количества лимфоцитов, экспрессирующих один или более CAR, описанных в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту, в результате чего лимфоциты индуцируют уничтожение раковых клеток у субъекта. В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы увеличения выживаемости субъекта, страдающего раком, при этом способы включают введение терапевтически эффективного количества лимфоцитов, экспрессирующих один или более описанных CAR, нуждающемуся в этом субъекту, в результате чего выживаемость субъекта увеличивается. Как правило лимфоциты, экспрессирующие CAR, вызывают уничтожение раковых клеток у субъекта и приводят к уменьшению или уничтожению опухолей/раковых клеток у субъекта. Не имеющий ограничительного характера перечень видов рака, включая метастатические поражения, на который можно воздействовать направленно, включает рак предстательной железы и рак молочной железы и их комбинации. В одном варианте осуществления рак, подлежащий лечению у субъекта, представляет собой рак предстательной железы и рак молочной железы.

В одном аспекте способы, описанные в настоящем документе, применимы к лечению нераковых состояний, которые могут развиться в раковые заболевания, таких как, например, увеличенная предстательная железа и высокие уровни ПСА при отсутствии диагностированного рака предстательной железы.

В одном аспекте предложены способы лечения субъекта, страдающего раком, которые включают введение терапевтически эффективного количества лимфоцитов, экспрессирующих CAR, CAR, имеющего внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает антиген hK2, нуждающемуся в этом субъекту, в результате чего лимфоцит вызывает уничтожение раковых клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-61.

В одном аспекте описан способ направленного уничтожения раковой клетки, включающий приведение раковой клетки в контакт с лимфоцитом, экспрессирующим один или более из описанных CAR, при этом лимфоцит индуцирует уничтожение раковой клетки. Не имеющий ограничительного характера перечень раковых клеток, включающий метастатические раковые клетки, на которые можно воздействовать направленно, включают рак предстательной железы и его комбинации. В одном варианте осуществления раковая клетка представляет собой клетку рака предстательной железы.

Когда указано терапевтически эффективное количество, точное количество CAR или CAR-T по настоящему изобретению для введения может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий по возрасту, весу, размеру опухоли, степени инфекции или метастазирования, а также состояния субъекта. В целом можно утверждать, что фармацевтическая композиция, содержащая описанные в данном документе Т-клетки, может вводиться в дозах от около 10^4 до около 10^{10} клеток/кг массы тела, в некоторых случаях от около 10^5 до около 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целые значения в этих диапазонах. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, описанные в данном документе, можно вводить в дозе около 10^6 клеток/кг массы тела. Композиции Т-клеток также могут вводиться несколько раз в этих дозах. Клетки могут вводиться с помощью методов инфузии, которые широко известны в области иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988).

Системы доставки, полезные в контексте CAR-T по изобретению, могут включать системы доставки с замедленным высвобождением, отсроченным высвобождением и пролонгированным высвобождением, так что доставка композиций Т-клеток происходит до и с достаточным временем, чтобы вызвать сенсибилизацию участка, подлежащего лечению. Композицию можно применять в сочетании с другими терапевтическими средствами или видами терапии. Такие системы позволяют избежать повторных введений композиции, тем самым повышая удобство для пациента и врача, и могут быть особенно подходящими для определенных вариантов осуществления композиции по изобретению.

Многие типы высвобождающих систем доставки доступны и известны специалистам в данной области. Они включают системы на основе полимеров, таких как поли(лактид-гликолид), сополиоксалаты, поликапролактоны, сложные полиэфирамиды, сложные полиортоэфиры, полигидроксимасляная кислота и полиангидриды. Микрокапсулы указанных выше полимеров, содержащие лекарственные средства, описаны, например, в патенте США №5075109. Системы доставки также включают неполимерные системы, которые представляют собой липиды, включая стерины, такие как холестерин, сложные эфиры холестерина и жирных кислот, или нейтральные жиры, такие как моно-, ди- и триглицериды; силастические системы; системы на основе пептидов; гидрогелевые системы высвобождения; восковые покрытия; прессованные таблетки с применением обычных связывающих веществ и наполнителей; частично сшитые импланты; и т. п. Инструменты включают, без ограничений, следующие: (a)

эрозионные системы, в которых агент согласно изобретению содержится в форме внутри матрицы, такие как описаны в патентах США № 4,452,775; № 4,667,014; №4748034; и № 5,239,660 и (b) диффузионные системы, в которых активный компонент высвобождается с контролируемой скоростью из полимера, такие как описаны в патентах США № 3,854,480 и № 3,832,253. Кроме того, могут применяться аппаратные системы доставки на основе насоса, некоторые из которых адаптированы для имплантации.

В определенных аспектах может быть необходимым введение активированных Т-клеток субъекту и затем повторное взятие крови (или осуществление афереза), активация Т-клеток в соответствии с данным изобретением и повторная инфузия субъекту этих активированных и размноженных Т-клеток. Этот процесс может выполняться несколько раз каждые несколько недель. В некоторых аспектах Т-клетки могут быть активированы во взятой крови объемом от 10 куб. см до 400 куб. см. В некоторых аспектах Т-клетки активируют во взятой крови объемом 20 куб. см, 30 куб. см, 40 куб. см, 50 куб. см, 60 куб. см, 70 куб. см, 80 куб. см, 90 куб. см или 100 куб. см.

Введение CAR-Т-клеток и композиций может осуществляться любым способом, например, путем парентерального или непарентерального введения, в том числе ингаляции аэрозоля, инъекции, инфузии, перорального введения, трансфузии, имплантации или трансплантации. Например, CAR-Т-клетки и композиции, описанные в данном документе, можно вводить пациенту трансартериально, внутрикожно, подкожно, внутриопухолево, интрамедуллярно, интранодально, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции или внутрибрюшинно. В одном аспекте составы, описанные в настоящем документе, вводят путем в/в инъекции. В одном аспекте композиции по настоящему изобретению вводят субъекту путем внутрикожной или подкожной инъекции. Композиции Т-клеток можно вводить, например, непосредственно в опухоль, лимфатический узел, ткань, орган или место инфекции.

Введение может быть аутологичным или неаутологичным. Например, иммунореактивные клетки, экспрессирующие CAR, специфичный к калликреину 2 (например, hK2) человека, могут быть получены от одного субъекта и введены тому же субъекту или другому совместимому субъекту. Т-клетки, полученные из периферической крови по настоящему изобретению, или размноженные Т-клетки (например, полученные in vivo, ex vivo или in vitro), можно вводить, например, посредством внутривенной инъекции, локальной инъекции, системной инъекции, катетерного введения или парентерального введения.

В конкретном варианте осуществления субъект может подвергаться лейкаферезу, при этом лейкоциты собирают, обогащают или деплецируют ex vivo, чтобы отобрать и/или выделить представляющие интерес клетки, например, Т-клетки. Эти Т-клеточные изоляты могут быть размножены известными в данной области техники способами и обработаны таким образом, что может быть введена одна или более конструкций CAR по настоящему изобретению, и, таким образом, создана CAR-Т-клетка. Нуждающиеся в этом субъекты могут впоследствии подвергаться стандартному лечению высокодозной химиотерапией с

последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых аспектах после трансплантации или одновременно с ней субъектам выполняют инфузию размноженных CAR-T-клеток. В одном аспекте размноженные клетки вводят до операции или после нее.

Доза, вводимая пациенту, имеющему злокачественные новообразования, является достаточной для ослабления или по меньшей мере частичной задержки заболевания, лечение которого осуществляется («терапевтически эффективное количество»). Дозировка вышеприведенных требующих введения субъекту препаратов будет варьироваться в зависимости от точной природы патологического состояния, подлежащего лечению, и пациента, получающего лечения. Масштабирование доз для введения человеку может быть выполнено в соответствии с общепринятыми в данной области техники практиками.

Т-клетки CAR по изобретению можно подвергать экспансии in vivo и возможно создавать hK2-специфические клетки памяти, которые сохраняются на высоких уровнях в течение продолжительного времени в крови и костном мозге. В некоторых случаях CAR Т-клетки по изобретению, введенные субъекту, могут уничтожать раковые клетки, например, клетки рака предстательной железы, in vivo у субъектов с резистентным к химиотерапии прогрессирующим раком.

В одном варианте осуществления CAR по настоящему изобретению вводят в Т-клетки, например, с использованием транскрипции in vitro, и субъект (например, человек) получает начальное введение CAR-T-клеток по настоящему изобретению и одно или более последующих введений CAR-T-клеток, при этом одно или более последующих введений проводят менее чем через 15 дней, например, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения. В одном варианте осуществления субъекту (например, человеку) вводят CAR-T-клетки более одного раза в неделю, например, 2, 3 или 4 введения CAR-T-клеток в неделю. В одном варианте осуществления субъект получает более одного введения CAR-T-клеток в неделю (например, 2, 3 или 4 введения в неделю) (что также называется в данном документе циклом), за которым следует перерыв введения CAR-T-клеток на одну неделю, а затем одно или более дополнительных введений CAR-T-клеток (например, более одного введения CAR-T-клеток в неделю) субъекту. В еще одном варианте осуществления субъекту выполняют более одного цикла введения CAR-T-клеток, а период времени между каждым циклом составляет менее чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, или 3 дня. В одном варианте осуществления CAR-T-клетки вводят через день, 3 введения в неделю. В одном варианте осуществления CAR-T-клетки по настоящему изобретению вводят в течение по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более недель.

В одном варианте осуществления введение можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более. Кроме того, возможны повторные курсы лечения в виде длительного введения. При повторном введении можно вводить

такую же дозу или другую дозу.

CAR-T-клетки можно вводить способами по настоящему изобретению с помощью поддерживающей терапии, такой как, например, один раз в неделю в течение 6 месяцев или более.

В одном варианте осуществления CAR-T-клетки генерируются с использованием лентивирусных векторов, таких как лентивирус. CAR-T-клетки, полученные с помощью таких вирусных векторов, как правило, будут иметь стабильную экспрессию CAR.

В одном варианте осуществления CAR-T-клетки транзиентно экспрессируют векторы CAR в течение 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 дней после трансдукции. На транзиентную экспрессию CAR может влиять доставка РНК-вектора CAR. В одном варианте осуществления РНК CAR трансдуцируют в Т-клетку путем электропорации.

Если пациент подвержен высокому риску развития ответа в форме выработки антител к CAR в ходе терапии с транзиентной экспрессией CAR (например, полученные путем трансдукции РНК), перерывы в инфузии CAR-T не должны длиться более, чем от десяти до четырнадцати дней.

Комбинированные терапии

hK2-связывающие белки по изобретению можно вводить в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим агентом.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент представляет собой хирургическое вмешательство, химиотерапию, андроген-депривационную терапию или облучение, или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления доставка одного средства лечения все еще происходит, когда начинается доставка второго средства лечения, таким образом, существует перекрытие с точки зрения введения. Иногда в настоящем документе это называется как «одновременная» или «сопутствующая доставка». В других вариантах осуществления доставка одного средства лечения заканчивается до начала доставки другого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления в любом из случаев лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе средство лечения является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшей дозе второго средства лечения, или же второе средство лечения снижает симптомы в большей степени, чем наблюдалось бы в том случае, если бы второе средство лечения вводили в отсутствие первого средства лечения, или же аналогичная ситуация наблюдается для первого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления доставка осуществляется таким образом, что снижение симптома или другого параметра, связанного с заболеванием, является более значительным, чем наблюдалось бы в том случае, если бы одно средство лечения доставляли в отсутствие другого. Эффект двух средств лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или большим чем аддитивный. Доставка может осуществляться таким образом, что эффект первого вводимого средства лечения все еще будет определяться во время доставки второго средства.

В одном варианте осуществления другие терапевтические агенты, такие как факторы, можно вводить до, после или одновременно (параллельно с) в виде hK2-связывающих белков, таких как CAR Т-клеток, включая, без ограничений, интерлейкины, а также колониестимулирующие факторы, такие как G-, M- и GM-CSF, и интерфероны.

hK2-связывающите белки, такие как клетки, экспрессирующие CAR, описанные в настоящем документе, и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент могут вводиться одновременно в одной или в отдельных композициях, либо вводиться последовательно. В случае последовательного введения hK2-связывающие белки, такие как клетка, экспрессирующая CAR, описанная в данном документе, можно вводить первыми, а дополнительный агент может вводиться вторым, либо же порядок введения может быть противоположным.

В дополнительных вариантах осуществления hK2-связывающие белки, такие как клетки, экспрессирующие CAR, описанные в настоящем документе, можно использовать в режиме лечения в комбинации с хирургическим вмешательством, лучевой или химиотерапией, иммуносупрессивным агентом, антителами или другими иммуноабляционными агентами. В другом варианте осуществления hK2-связывающие белки, такие как клетка, экспрессирующая CAR, описанная в настоящем документе, можно использовать в комбинации с антиандрогенным лечением. В одном варианте осуществления субъекту могут вводить вещество, которое повышает активность экспрессирующей CAR клетки. Например, в одном варианте осуществления агент может быть таким, который ингибирует ингибирующую молекулу.

БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Ниже представлены варианты осуществления биспецифических антител к hk2/CD3 по изобретению.

KLCB91

В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антитела к hK2/антитела CD3 содержит первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 275, 258, 259 и 261, соответственно. В соответствии с вариантом осуществления первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 136, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251. В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антигена к hK2/антигена CD3 содержит HC1 SEQ ID NO: 351, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

KLCB105

В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антитела к hK2/антитела к CD3 содержит первый домен, который связывает hK2, и второй домен,

который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно. В соответствии с вариантом осуществления первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 136, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123. В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антигена к hK2/антигена CD3 содержит HC1 SEQ ID NO: 351, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272.

KLCB95

В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антитела к hK2/антитела к CD3 содержит первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно. В соответствии с вариантом осуществления первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 134, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251. В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антигена к hK2/антигена CD3 содержит HC1 SEQ ID NO: 352, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

KLCB96

В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антитела к hK2/антитела к CD3 содержит первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно. В соответствии с вариантом осуществления первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 134, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123. В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антигена к hK2/антигена CD3 содержит HC1 SEQ ID NO: 352, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272.

KLCB170

В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антитела к hK2/антитела к CD3 содержит первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2,

содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно. В соответствии с вариантом осуществления первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 325, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251. В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антигена к hK2/антигена CD3 содержит HC1 SEQ ID NO: 353, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

KLCB80

В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антитела к hK2/антитела CD3 содержит первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно. В соответствии с вариантом осуществления первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331. В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антигена к hK2/антигена CD3 содержит HC1 SEQ ID NO: 354, LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2 SEQ ID NO: 360.

KLCB81

В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антитела к hK2/антитела к CD3 содержит первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186 и 187, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно. В соответствии с вариантом осуществления первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 444, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331. В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антигена к hK2/антигена CD3 содержит HC1 SEQ ID NO: 355, LC1 SEQ ID NO: 223, и HC2 SEQ ID NO: 360.

KLCB113

В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антитела к hK2/антитела к CD3 содержит первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 176, 177, 178,

179, 180 и 181, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно. В соответствии с вариантом осуществления первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331. В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антигена к hK2/антигена CD3 содержит HC1 SEQ ID NO: 356, LC1 SEQ ID NO: 222, и HC2 SEQ ID NO: 360.

KLCB281

В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антитела к hK2/антитела к CD3 содержит первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно. В соответствии с вариантом осуществления первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 325, а второй связывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123. В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антигена к hK2/антигена CD3 содержит HC1 SEQ ID NO: 353, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272.

KLCB174

В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антитела к hK2/антитела к CD3 содержит первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, 209, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно. В соответствии с вариантом осуществления первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 316, а второй связывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123. В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антигена к hK2/антигена CD3 содержит HC1 SEQ ID NO: 357, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272.

KLCB153

В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антитела к hK2/антитела к CD3 содержит первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, 209, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный

антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно. В соответствии с вариантом осуществления первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 316, а второй связывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 151. В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антигена к hK2/антигена CD3 содержит HC1 SEQ ID NO: 357, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

KLCB245

В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антитела к hK2/антитела CD3 содержит первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно. В соответствии с вариантом осуществления первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331. В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антигена к hK2/антигена CD3 содержит HC1 SEQ ID NO: 361, LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2 SEQ ID NO: 362.

Представленные ниже примеры приведены для дополнительного описания некоторых из вариантов осуществления, раскрываемых в настоящем документе. Примеры призваны проиллюстрировать, но не ограничить, раскрываемые варианты осуществления.

ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

В настоящем описании также предложены следующие пронумерованные варианты осуществления:

1. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает связанную с калликреином пептидазу 2 (hK2), причем указанный антигенсвязывающий домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

2. Выделенный белок по варианту осуществления 1, причем антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или по меньшей мере на 100%) идентична VH SEQ ID NO: 162.

3. Выделенный белок по варианту осуществления 2, причем антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162.

4. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1-3, причем антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

5. Выделенный белок по варианту осуществления 4, причем антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VL SEQ ID NO: 163.

6. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1-5, причем антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой Fab.

7. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1-6, причем белок конъюгирован с фрагментом, продлевающим период полужизни, при этом фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой иммуноглобулин (Ig), фрагмент Ig, константную область Ig или фрагмент константной области Ig.

8. Выделенный белок по варианту осуществления 7, причем константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению связывания белка с Fcγрецептором (FcγR), причем, необязательно, мутации, которые приводят к снижению связывания белка с FcγR, представляют собой L234A_L235A_D265S.

9. Выделенный белок по варианту осуществления 7 или 8, причем белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 константной области Ig, при этом, необязательно, мутации в домене CH3 константной области Ig представляют собой T350 V_T366L_K392L_T394W.

10. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 7-9, причем константная область тяжелой цепи IgG содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или по меньшей мере на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 378.

11. Выделенный белок по варианту осуществления 9, причем константная область тяжелой цепи IgG содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 378.

12. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 7-11, причем константная область легкой цепи IgG содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 309.

13. Выделенный белок по варианту осуществления 12, в котором константная область легкой цепи IgG содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 309.

14. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1-13, причем выделенный белок содержит HC, которая по меньшей мере 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%), идентична SEQ ID NO: 354.

15. Выделенный белок по варианту осуществления 14, причем выделенный белок содержит HC SEQ ID NO: 354.

16. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1-15, причем выделенный белок содержит LC, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99%

или на 100%) идентична SEQ ID NO: 221.

17. Выделенный белок по варианту осуществления 16, причем выделенный белок содержит LC SEQ ID NO: 221.

18. Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1-17, причем выделенный белок представляет собой мультиспецифический белок.

19. Выделенный белок по варианту осуществления 18, причем мультиспецифический белок представляет собой биспецифический белок.

20. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 18 или 19, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген.

21. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 20, причем лимфоцит представляет собой Т-клетку.

22. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 21, причем Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку.

23. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 22, причем лимфоцит представляет натуральную клетку-киллер (NK).

24. Мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 20-23, причем лимфоцитарный антиген представляет собой CD3, эпсилон CD3 (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195 или NKG2C.

25. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 24, причем лимфоцитарный антиген представляет собой CD3ε.

26. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 25, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит

a. определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1) SEQ ID NO: 116, HCDR2 SEQ ID NO: 117, HCDR3 SEQ ID NO: 118, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) SEQ ID NO: 119, LCDR2 SEQ ID NO: 120 и LCDR3 SEQ ID NO: 121; или

b. VH с SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123.

27. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 25, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 157.

28. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 25, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит

a. определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1) SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259, и LCDR3 SEQ ID NO: 260; или

b. HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259, и LCDR3 SEQ ID NO: 261; или

c. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 249; или

d. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 250; или

e. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251; или

f. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 252; или

g. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 253; или

h. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 254.

29. Мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 25, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259, и LCDR3 SEQ ID NO: 261.

30. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 29, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или по меньшей мере на 100%) идентична VH SEQ ID NO: 248.

31. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 30, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VH SEQ ID NO: 248.

32. Мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 29-31, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VH SEQ ID NO: 251.

33. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 32, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VL SEQ ID NO: 251.

34. Мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 25-33, причем антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, представляет собой scFv.

35. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 34, причем scFv по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или по меньшей мере или на 100%) идентичен scFv VH SEQ ID NO: 331.

36. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 35, причем scFv представляет собой scFv SEQ ID NO: 331.

37. Мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 25-36, причем антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, конъюгирован с фрагментом, продлевающим период полужизни, при этом фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой иммуноглобулин (Ig), фрагмент Ig, константную область Ig или фрагмент константной области Ig.

38. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 37, причем константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая, необязательно, приводит к снижению связывания белка с Fcγрецептором (FcγR), при этом мутации, которые приводят к снижению связывания белка с FcγR, представляют собой L234A_L235A_D265S.

39. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 37 или 38, причем белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 константной области Ig, при этом, необязательно, мутации в домене CH3 константной области Ig представляют собой T350 V_L351Y_F405A_Y407 V.

40. Мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 37-39, причем константная область IgG содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например*, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 109.

41. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 40, причем константная область IgG содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109.

42. Мультиспецифический белок по любому из пп. 25-41, причем белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 360.

43. Мультиспецифический белок по варианту осуществления 42, причем линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 360.

44. Мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 25-43, причем антигенсвязывающий домен связывает CD3 в эпитопах, имеющих последовательности SEQ ID NO: 341, 448 и 449.

45. Выделенный белок антитела к hK2/CD3, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно.

46. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по варианту осуществления 45, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VH SEQ ID NO: 162

47. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по варианту осуществления 46, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162

48. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из вариантов осуществления 45-47, причем первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

49. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по варианту осуществления 48, причем первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VL SEQ ID NO: 163.

50. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из вариантов

осуществления 45-49, причем второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv, который по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичен scFv SEQ ID NO: 331.

51. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по варианту осуществления 50, причем второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331.

52. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из вариантов осуществления 45-51, причем выделенный мультиспецифический белок содержит HC1, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична scFv SEQ ID NO: 354.

53. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по варианту осуществления 52, причем выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 354.

54. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из вариантов осуществления 45-53, причем выделенный мультиспецифический белок содержит LC1, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична LC1 SEQ ID NO: 221.

55. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по варианту осуществления 54, причем выделенный мультиспецифический белок содержит LC1 SEQ ID NO: 221.

56. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из вариантов осуществления 45-55, причем выделенный мультиспецифический белок содержит HC2, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична HC2 SEQ ID NO: 360.

57. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по варианту осуществления 56, причем выделенный мультиспецифический белок содержит HC2 SEQ ID NO: 360.

58. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из вариантов осуществления 52-57, причем выделенный мультиспецифический белок содержит лизин (например, K477) на C-конце HC1 и HC2.

59. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по варианту осуществления 58, причем выделенный мультиспецифический белок содержит HC1, которая по меньшей мере на 80% (*например*, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична HC1 SEQ ID NO: 361.

60. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по варианту осуществления 59, причем выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 361.

61. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из вариантов осуществления 58-60, причем выделенный мультиспецифический белок содержит HC2, которая по меньшей мере на 80% (*например*, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере

на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична HC2 SEQ ID NO: 362.

62. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по варианту осуществления 61, причем выделенный мультиспецифический белок содержит HC2 SEQ ID NO: 362.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение антител к hK2 и scFvs

Получение антител посредством гуманизации исходного антитела m11B6.

m11B6 (исходное мышиное антитело к HK2) описано в Väisänen et al (Clinical Chemistry 50:9,1607-1617 (2004)). Гуманизированный 11B6 (упоминаемый в настоящем документе как hu11B6) был получен и описан в патенте США № 9,345,782 и патенте США № 10,100,125.

Конструирование hu11B6 было инициировано для создания дополнительных антител к HK2 с улучшенными свойствами, такими как улучшенная термостабильность. Позиции остатков были идентифицированы в каркасах hu11B6, которые потенциально могут быть изменены для улучшения термостабильности hu11B6 с помощью моделирования. Идентифицированные позиции представляли собой остатки P41, I49, M70 и A88 в VH и S80, L82, A88 и Y91 в VL (нумерация остатков в соответствии с аминокислотными последовательностями hu11B6_VH **SEQ ID NO: 5** и hu11B6_VL **SEQ ID NO: 2**).

В ориентации VH-линкер-VL были сформированы двоичные комбинаторные библиотеки scFv, в которых одна из вариабельных областей представляла собой комбинаторную библиотеку, а вторая - родительскую hu11B6 VH или VL. Линкерную последовательность **GGSEGKSSGSGSESKGGS (SEQ ID NO: 7)** использовали для конъюгации областей VH/VL. Сконструированные scFv экспрессировали в E coli, а полученные scFv в супернатантах тестировали на предмет связывания с hK2 человека методом твердофазного ИФА и сравнивали со связыванием hu11B6. Любые новые варианты, демонстрирующие связывание с hu11B6, консолидировали и дополнительно исследовали на предмет связывания с hK2 человека после инкубации супернатантов при 55°C, 60°C и 65°C в течение 10 минут. Молекулы, сохраняющие сопоставимое связывание с hu11B6 после инкубации при 55°C, 60°C и 65°C и улучшенную термостабильность помещали в матрицу в обеих ориентациях (VH-линкер-VL; VL-линкер-VH) и преобразовывали в scFv млекопитающих для дальнейшего определения характеристик. Помещенные в матрицу scFv также включали в конструкты CAR и дополнительно характеризовали, как дополнительно описано в примере 11.

Кроме того, другая гуманизация исходной мышиной 11B6 выполнялась в соответствии с подходом, описанным Singh et al (MAbs. 2015;7(4):778-91) с обширными вариациями зародышевой линии и тщательным скринингом вариантов для повышения термостабильности. На основании сохранения последовательностей для адаптации каркасной области выбрали зародышевую линию тяжелой цепи IGHV4-30 человека и зародышевую линию легкой цепи IGKV3D-11. Дифференцированная библиотека scFv

конструировалась с остатками, содержащими выбранный набор соматических сайтов гипермутации и вариации мышиной/человеческой зародышевой линии. Варианты клонировали и экспрессировали в E. coli, как описано выше. Супернатанты подвергали скринингу при различных температурах в единичных измерениях методом твердофазной ИФА для повышения термостабильности. В качестве родительского контроля использовали химерный Fab мышиного/человеческого 11B6. Клон KL2B359, который сохранил связывающую активность, аналогичную мышиному 11B6 и значение Tm, равное 67°C, преобразовали в scFv-Fc и CAR-T для дополнительного профилирования. Аффинность (K_D) KL2B359 к hK2, измеренная методом SPR, составляла ~ 0,7-1 нМ. HCF3-LCD6, HCG5-LCB7, KL2B357, KL2B358 и KL2B360 также получали в результате этой кампании и дополнительно характеризовали на основании функциональности.

Получение антител с использованием трансгенных мышей (Ablexis®) и трансгенных крыс (OmniRat®), экспрессирующих локусы иммуноглобулина человека.

Крысы OmniRat® содержат химерный человеческий/крысиный локус IgH (содержащий 22 человеческих сегмента V_Hs, все человеческие сегменты D и J_H в естественной конфигурации, связанные с крысиным локусом C_H), а также полностью человеческие локусы IgL (12 Vκs, связанных с Jκ-Cκ, и 16 Vλs, связанных с Jλ-Cλ). (см. например, Osborn, et al. (2013) J Immunol 190(4): 1481-1490). Соответственно, крысы демонстрируют сниженную экспрессию крысиного иммуноглобулина, и в ответ на иммунизацию внедренные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепей переключаются на экспрессию другого класса и подвергаются соматической мутации для создания высокоаффинных химерных человеческих/крысиных моноклональных антител IgG с полностью человеческими вариабельными областями. Получение и применение OmniRat® и геномные модификации в таких крысах описаны в WO14/093908.

Мыши линии Ablexis® производят антитела, имеющие вариабельные домены человека, связанные с доменами CH1 и CL человека, химерной человеческой/мышиной шарнирной областью и мышиными Fc-областями. Мыши линий Ablexis Kappa и Lambda различаются тяжелыми цепями, которые являются человеческими или мышиными, как отмечено ниже. Антитела, продуцируемые мышами линии Kappa, не имеют последовательности, полученной из мышиных экзонов V_H, D_H и J_H и мышиных экзонов Vκ, Jκ и Cκ. Эндогенный мышиный Igλ активен у мышей линии Kappa. Цепи Igκ человека содержат приблизительно 90-95% наивных репертуаров, а цепи Igλ мышей содержат приблизительно 5-10% наивных репертуаров в этой линии. Антитела, продуцируемые мышами линии Lambda, не имеют последовательности, полученной из мышиных экзонов V_H, D_H и J_H и мышиных экзонов Vλ, Jλ и Cλ. Эндогенный мышиный Igκ активен у мышей линии Lambda. Цепи Igλ человека содержат приблизительно 40% наивных репертуаров, а цепи Igκ мыши, содержат приблизительно 60% наивных репертуаров. Получение и применение мышей линии Ablexis® и геномные модификации в таких мышах описаны в документе WO11/123708.

Мышей линии Abblexis и крыс линии OmniRats иммунизировали растворимым полноразмерным белком KLK2 (человеческий калликреин-2 6-His белок).

человеческий калликреин-2 6-His белок

VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCLKK NSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDSSHDLMLLRLSE PAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLRPRSLQCVSLHYSEKVTEFMLC AGLWTGGKDTCGGDSGGPLVCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKD TIAANPHHHHHH (SEQ ID NO: 454)

Лимфоциты от мышей линии Abblexis и крыс линии OniRats экстрагировали из лимфатических узлов и проводили слияния по когортам. Клетки объединяли и сортировали на основании экспрессии CD138. Скрининг гибридомы проводили в формате миниатюрного MSD с высокой пропускной способностью с использованием растворимого антигена к hK2. Было установлено, что приблизительно более 300 образцов способны связывать hK2. Связывание более 300 образцов супернатанта антител к hKLK2 с белком KLK2 человека измеряли методом оценки кинетики одиночного цикла с помощью чувствительного элемента Biacore 8K SPR. Кроме того, образцы супернатанта исследовали на связывание с белком KLK3 человека. Параллельно также тестировали супернатанты на связывание с клеточными линиями, экспрессирующими KLK2, линией VCap и отрицательной клеточной линией DU145 методом проточной цитометрии. Выбранные вещества, связывающие клетки, стимулировали для конверсии scFv как в ориентации VH-VL, так и в ориентации VL/VH, а также в тестах оценки термостабильности, как описано выше. KL2B413, KL2B30, KL2B53 и KL2B242 получали в результате иммунизации мышей линии Abblexis. KL2B467 и KL2B494 получали в результате иммунизации крыс линии OmniRat.

Антитела, полученные посредством различных кампаний иммунизации и гуманизации, описанных выше, экспрессировали в формате fab, формате мАт, формате scFv в ориентации VH-линкер-VL или формате scFv в ориентации VL-линкер-VH и дополнительно анализировали, как описано ниже. Линкерную последовательность SEQ ID NO: 7, описанную выше, использовали для конъюгирования областей VH/VL.

Пример 2. Определение структурных характеристик антител к KLK2

В настоящем документе представлены вариабельные домены антитела и фрагменты антител scFv, которые демонстрировали наивысшую эффективность при внутриклеточном анализе. Вариабельные домены экспрессировали в формате Fab, формате scFv в ориентации VH-линкер-VL или формате scFv в ориентации VL-линкер-VH.

Вариабельные домены VH, VL и CDR

В **таблице 3** приведены аминокислотные последовательности VH и VL выбранных антител к hK2. В **таблице 4** показаны HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к hK2 по Кэботу. В **таблице 5** показаны LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбранных антител к hK2 по Кэботу. В **таблице 6** показы мАт HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к

hK2. В **таблице 7** показаны мАт LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антител к hK2. В **таблица 8** обобщена последовательность вариабельного домена и SEQ ID NO выбранных антител к hK2. В **таблице 9** показан белок и ДНК SEQ ID NO для областей VH и VL.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности VH и VL выбранных антител к hK2.

Название Ат	Название VH	Аминокислотная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Название VL	Аминокислотная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
m11B6	m11B6_VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTTYSPSLKSRFSITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYFCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	125	m11B6_VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYFGTSLMHWYRQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIQPVEEDDFSMYFCQQTRKVPYTFGGGTKLEIK	124
h11B6	hu11B6_VH	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	5	hu11B6_VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	2
HCF3-LCD6	HCF3_VH	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	6	LCD6_VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	1
HCG5-LCB7	HCG5_VH	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	4	LCB7_VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	3

KL2B357	KL2B357_VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	159	KL2B357_VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	160
KL2B358	KL2B358_VH	VQLQESGPGLVKPSQLSLTCTVSGNSITSDYWNWIRQPPGKGLEWYISYSGSTTYNPSLKRVTISRDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCAGYYYGSGFWGQGTLTVSS	161	KL2B358_VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	140
KL2B359	KL2B359_VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	139	KL2B359_VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	140
KL2B360	KL2B360_VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	159	KL2B360_VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	140
KL2B413	KL2B413_VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILTGHYGMDVWGQGTTVTVSS	137	KL2B413_VL	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIK	138

KL2B30	KL2B30_VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSS	162	KL2B30_VL	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK	163
KL2B53	KL2B53_VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMDSLRVEDSAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMVTVSS	164	KL2B53_VL	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGTRLEIK	165
KL2B242	KL2B242_VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQGTLVTVSS	166	KL2B242_VL	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVL	167
KL2B467	KL2B467_VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSS	168	KL2B467_VL	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTV	169
KL2B494	KL2B494_VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDGM	204	KL2B494_VL	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTK	205

		DVWGQGTMVTVSS			LTVL	
KL2B242LC_C33S	KL2B242_VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQGTLVTVSS	166	KL2B242LC_C33S_VL	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYASWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVL	444

Таблица 4. Аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к KLK2 по Кэботу.

	HCDR1 по Кэботу		HCDR2 по Кэботу		HCDR3 по Кэботу	
Название Ат	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO
m11B6	SDYAWN	63	YISYSGSTTYSPSLKS	64	GYYYGSGF	66
hu11B6	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNPSLKS	65	GYYYGSGF	66
HCF3-LCD6	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNPSLKS	65	GYYYGSGF	66
HCG5-LCB7	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNPSLKS	65	GYYYGSGF	66
KL2B357	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNPSLKS	65	GYYYGSGF	66
KL2B358	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNPSLKS	65	GYYYGSGF	66
KL2B359	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNPSLKS	65	GYYYGSGF	66
KL2B360	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNPSLKS	65	GYYYGSGF	66
KL2B413	SYWMT	141	NIKQDGSERYYVDSVKG	142	DQNYDILTGHYGMDV	143
KL2B30	SYYWS	170	YIYYSGSTNYNPSLKS	171	TTIFGVVTPNFYYGMDV	172
KL2B53	SYDIH	176	IISYDGSKKDYTDSVKG	177	ESGWSHYYYYGMDV	178
KL2B242	SYYWS	170	RLYVSGFTNYNPSLKS	183	DSGNYWGWFDP	184
KL2B467	YYGMH	188	FISYDGSNKYYADSVKG	189	LPYSGSYWAFDY	190
KL2B494	HYAMS	206	TIGGSGGSTYYADSVKG	207	PHIVMVTALLYDGMDV	208

Таблица 5. Аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3

выбранных антител к hK2 по Кэботу.

	LCDR1 по Кэботу		LCDR2 по Кэботу		LCDR3 по Кэботу	
Название Ат	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO
m11B6	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
hu11B6	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCF3-LCD6	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCG5-LCB7	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
KL2B357	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B358	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B359	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B360	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B413	RASQGISSYLS	144	ATSTLQS	145	QQLNSYPRT	146
KL2B30	RASQGISSYLA	173	AASTLQS	174	QQLNSYPLT	175
KL2B53	RASQDISNYLA	179	AASTLHS	180	QKYNSAPYT	181
KL2B242	SGDQLGENYAC	185	QDSKRPS	186	QAWDNSIVV	187
KL2B467	GGDNIGSKSVH	191	DNSDRPS	192	QVWDSSSDHPVV	193
KL2B494	GGNNIGSKSVH	182	DDSDRPS	470	QVWDSSSDHVV	209

Таблица 6. Аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 мАт выбранных антител к hK2 по AbM.

	HCDR1 AbM		HCDR2 AbM		HCDR3 AbM	
Название Ат	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO
m11B6	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
hu11B6	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
HCF3-LCD6	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
HCG5-LCB7	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
KL2B357	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66

KL2B358	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
KL2B359	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
KL2B360	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
KL2B413	GFTFSSYWMT	147	NIKQDGSERY	148	DQNYDILTGHYGMDV	143
KL2B30	GGSISSYYWS	194	YIYYSGSTN	195	TTIFGVVTPNFYYGMDV	172
KL2B53	GFTFSSYDIH	196	IISYDGSKKD	197	ESGWSHYYYYGMDV	178
KL2B242	GGSISSYYWS	198	RLYVSGFTN	199	DSGNYWGWFDP	184
KL2B467	GFTFSYY	200	FISYDGSNKY	201	LPYSGSYWAFDY	190
KL2B494	GFTFSHYAMS	216	TIGGSGGSTYY	217	PHIVMVTALLYDGMDV	218

Таблица 7. Аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 мАт выбранных антител к hK2 по AbM.

	LCDR1 AbM		LCDR2 AbM		LCDR3 AbM	
Название Ат	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO
m11B6	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
hu11B6	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCF3-LCD6	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCG5-LCB7	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
KL2B357	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B358	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B359	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B360	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71

KL2B413	RASQGISSYLS	144	ATSTLQS	145	QQLNSYPRT	146
KL2B30	RASQGISSYLA	173	AASTLQS	174	QQLNSYPLT	175
KL2B53	RASQDISNYLA	179	AASTLHS	180	QKYNSAPYT	181
KL2B242	SGDQLGENYAC	185	QDSKRPS	186	QAWDNSIVV	187
KL2B467	GGDNIGSKSVH	191	DNSDRPS	192	QVWDSSSDHPVV	193
KL2B494	GGNNIGSKSVH	182	DDSDRPS	470	QVWDSSSDHVV	209

Таблица 8. Аминокислотные последовательности и сводный обзор SEQ ID NO вариабельных доменов выбранных антител к hK2

Название антитела	Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
m11B6	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYSPSLKS	64
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (m11B6_VH)	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTTYSPSLKSRFSITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYFCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	125
	VL (m11B6_VL)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYFGTSLMHWYRQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIQPVEEDDFSMYFCQQTRKVPYTFGGGTKLEIK	124
h11B6	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	KASESVEYFGTSLMH	68
	LCDR2	AASNRES	70
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (hu11B6_VH)	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFW	5

		GQGTLVTVSS	
	VL (hu11B6_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLE IK	2
HCF3-LCD6	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	KASESVEYFGTSLMH	68
	LCDR2	AASNRES	70
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (HCF3_VH)	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRD TSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWG QGTLVTVSS	6
	VL (LCD6_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLE IK	1
HCG5-LCB7	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	KASESVEYFGTSLMH	68
	LCDR2	AASNRES	70
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (HCG5_VH)	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISR DTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFW GQGTLVTVSS	4
	VL (LCB7_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLE IK	3
KL2B357	HCDR1	SDYAWN	63

	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (KL2B357_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWG QGTLVTVSS	159
	VL (KL2B_357_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVE IK	160
KL2B358	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (KL2B358_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWN WIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWG QGTLVTVSS	161
	VL (KL2B_358_VL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGT DFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEI K	140
KL2B359	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWN	139

	(KL2B359_VH)	WIRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWG QGTLVTVSS	
	VL (KL2B_359_VL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGT DFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEI K	140
KL2B360	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (KL2B360_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWG QGTLVTVSS	159
	VL (KL2B_360_VL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGT DFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEI K	140
KL2B413	HCDR1	SYWMT	141
	HCDR2	NIKQDGSERYYVDSVKG	142
	HCDR3	DQNYDILTGHYGMDV	143
	LICDR1	RASQGISSYLS	144
	LCDR2	ATSTLQS	145
	LCDR3	QQLNSYPRT	146
	VH (KL2B413_VH)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMT WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDIL TGHYGMDVWGQGTTVTVSS	137
	VL (KL2B_413_VL)	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSWYQ QKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIK	138

KL2B30	HCDR1	SYYWS	170
	HCDR2	YIYYSGSTNYNPSLKS	171
	HCDR3	TTIFGVVTPNFYYGMDV	172
	LICDR1	RASQGISSYLA	173
	LCDR2	AASTLQS	174
	LCDR3	QQLNSYPLT	175
	VH (KL2B30_VH)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWI RQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYY GMDVWGQGTTVTVSS	162
	VL (KL2B30_VL)	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQ QKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK	163
KL2B53	HCDR1	SYDIH	176
	HCDR2	IISYDGSKKDYTDSVKG	177
	HCDR3	ESGWSHYYYYGMDV	178
	LICDR1	RASQDISNYLA	179
	LCDR2	AASTLHS	180
	LCDR3	QKYNSAPYT	181
	VH (KL2B53_VH)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHW VRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMDSLRVED SAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMVTVSS	164
	VL (KL2B53_VL)	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWY QQKPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGTRLEIK	165
KL2B242	HCDR1	SYYWS	170
	HCDR2	RLYVSGFTNYNPSLKS	183
	HCDR3	DSGNYWGWFDP	184
	LICDR1	SGDQLGENYAC	185
	LCDR2	QDSKRPS	186
	LCDR3	QAWDNSIVV	187
	VH (KL2B242_VH)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSW LRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLD	166

		PSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWF DPWGQGTLVTVSS	
	VL (KL2B242_VL)	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQ QKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVL	167
KL2B467	HCDR1	YYGMH	188
	HCDR2	FISYDGSNKYYADSVKG	189
	HCDR3	LPYSGSYWAFDY	190
	LICDR1	GGDNIGSKSVH	191
	LCDR2	DNSDRPS	192
	LCDR3	QVWDSSSDHPVV	193
	VH (KL2B467_VH)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMH WVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSY WAFDYWGQGTQVTVSS	168
	VL (KL2B467_VL)	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQ QKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLT ISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTV	169
KL2B494	HCDR1	HYAMS	206
	HCDR2	TIGGSGGSTYYADSVKG	207
	HCDR3	PHIVMVTALLYDGMDV	208
	LCDR1	GGNNIGSKSVH	182
	LCDR2	DDSDRPS	470
	LCDR3	QVWDSSSDHVV	209
	VH (KL2B494_VH)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMS WVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVT ALLYDGMDVWGQGTMVTVSS	204
	VL (KL2B494_VL)	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQ QKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATL TISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTV L	205

Таблица 9. SEQ ID NO последовательностей белков и ДНК доменов VH и VL выбранных антител hK2.

Антитело	Белок VH SEQ ID NO:	Белок VL, SEQ ID NO:	кДНК VH с SEQ ID NO:	кДНК VL с SEQ ID NO:
m11B6	125	124	225	237
hu11B6	5	2	226	238
HCF3-LCD6	6	1	227	239
HCG5-LCB7	4	3	228	240
KL2B357	159	160	229	241
KL2B358	161	140	230	242
KL2B359	139	140	231	242
KL2B360	159	140	229	242
KL2B413	137	138	232	243
KL2B30	162	163	233	244
KL2B53	164	165	234	245
KL2B242	166	167	235	246
KL2B467	168	169	236	247
KL2B494	204	205	263	271

SEQ ID NO:225 (кДНК VH m11B6)

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCTGGACCCGGACTTGTTAAACCAAGTCAGTCTC
TGTCCCTGACCTGTACCGTCACCGGCAACAGCATCACAAGCGATTACGCATGGAACT
GGATCAGGCAGTTCCCTGGAAATCGACTCGAATGGATGGGCTACATTTCATACTCCG
GTTCAACCACTTACTCTCCATCCTTGAAATCTAGGTTCAGCATCACCCGTGATACCTC
AAAGAACCAATTTTTTCTGCAACTGAATAGCGTAACTCCAGAGGACACAGCCACAT
ATTTCTGCGCCACTGGGTATTACTATGGCTCAGGTTTCTGGGGTCAGGGCACTCTCG
TCACCGTCAGCAGC

SEQ ID NO: 226 (кДНК VH hu11B6)

CAGGTCCAACTGCAAGAGAGCGGACCGGGCCTGGTAAAGCCATCCGACACA
TTGTCCCTGACGTGTGCGGTAAGTGGAAACTCTATCACTAGCGACTATGCGTGGAAT
TGGATAAGACAACCGCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGATAGGATATATCAGCTATTC
CGGTTCTACGACATACAATCCTTCCCTGAAAAGCAGAGTCACTATGTCACGCGACAC
GTCCAAGAATCAGTTCTCATTGAAATTGTCATCCGTAACGGCCGTTGACACTGCGGT
TTATTATTGCGCAACCGGATATTACTACGGCTCTGGTTTTTGGGGACAGGGAACACT
TGTTACTGTTAGTTCA

SEQ ID:NO 227 (кДНК VH HC3-LCD6)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGCGACACC
CTGAGCCTGACCTGCGCCGTGAGCGGCAACAGCATCACCAGCGACTACGCCTGGAA
CTGGATCCGCCAGTTCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACATCAGCTACA
GCGGCAGCACCACCTACAACCCAAGCCTGAAGAGCCGCGTCACCATCAGCCGCGAC

ACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCCCTGTGGACACCGC
CGTGTACTACTGCGCCACCGGCTACTACTACGGCAGCGGCTTCTGGGGCCAGGGCAC
CCTGGTGACCGTGAGCAGC

SEQ ID NO: 228 (кДНК VH HCG5-LCB7)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGCGACACC
CTGAGCCTGACCTGCGCCGTGAGCGGCAACAGCATCACCAGCGACTACGCCTGGAA
CTGGATCCGCCAGTTCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTACATCAGCTACA
GCGGCAGCACCACCTACAACCCAAGCCTGAAGAGCCGCGTCACCATCAGCCGCGAC
ACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCCCTGTGGACACCGC
CGTGTACTACTGCGCCACCGGCTACTACTACGGCAGCGGCTTCTGGGGCCAGGGCAC
CCTGGTGACCGTGAGCAGC

SEQ ID NO: 229 (кДНК VH KL2B357, KL2B360)

CAGGTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCAGGCCTGGTCAAGCCCTCTCAGACCC
TGTCTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCAACTCCATCACCTCTGACTACGCCTGGAACT
GGATTCGGCAGTTCCCTGGCAAGGGCCTTGAGTGGATCGGCTACATCTCCTACTCCG
GTTCCACCACCTACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGGTCACCATCTCCCGCGACACCT
CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTGT
ACTACTGTGCCACCGGCTACTACTACGGCTCCGGCTTTTGGGGACAGGGCACACTGG
TTACCGTGTCTAGT

SEQ ID NO: 230 (кДНК VH KL2B358)

CAGGTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCAGGCCTGGTCAAGCCCTCTCAGACCC
TGTCTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCAACTCCATCACCTCTGACTACGCCTGGAACT
GGATTCGGCAGCCACCTGGCAAGGGCCTTGAGTGGATCGGCTACATCTCCTACTCCG
GTTCCACCACCTACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGGTCACCATCTCCCGCGACACCT
CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTGT
ACTACTGTGCCACCGGCTACTACTACGGCTCCGGCTTTTGGGGACAGGGCACACTGG
TTACCGTGTCTAGT

SEQ ID NO: 231 (кДНК VH KL2B359)

CAGGTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCAGGCCTGGTCAAGCCCTCTCAGACCC
TGTCTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCAACTCCATCACCTCTGACTACGCCTGGAACT
GGATTCGGCAGTTCCCTGGCAAGCGCCTTGAGTGGATCGGCTACATCTCCTACTCCG
GTTCCACCACCTACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGGTCACCATCTCCCGCGACACCT
CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTGT
ACTACTGTGCCACCGGCTACTACTACGGCTCCGGCTTTTGGGGACAGGGCACACTGG
TTACCGTGTCTAGT

SEQ ID NO: 232 (кДНК VH KL2B413)

GAGGTGCAACTTGTGGAGAGCGGCGGAGGTCTGGTCCAACCCGGAGGAAGT
CTCCGTCTCTCCTGTGCTGCTAGTGGCTTCACTTTCAGCTCATATTGGATGACATGGG
TGAGACAAGCCCCAGGAAAGGGGCTCGAGTGGGTAGCTAACATTAAACAGGACGG
CTCCGAACGGTACTATGTTGATTCTGTGAAGGGACGGTTCACTATATCCAGGGATAA

TGCAAAAAATTCACTCTATCTTCAAATGAACTCACTCAGAGCAGAGGACACTGCCGT
GTATTATTGCGCCAGGGATCAAAATTATGACATACTGACCGGTCATTATGGAATGGA
TGTTTGGGGCCAGGGAACAACCGTTACCGTCTCAAGT

SEQ ID NO:233 (кДНК VH KL2B30)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCC
TGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGAT
CCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGATATATCTATTACAGTGGGA
GCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCA
AGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATT
ACTGTGCGGGGACTACGATTTTTGGAGTGGTTACCCCCAACTTCTACTACGGTATGG
ACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 234 (кДНК VH KL2B53)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTATGACATACACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATTTCATATGATGGA
AGTAAAAAAGACTATACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGTTGAGGACTCGGCTG
TGTATTCCTGTGCGAGAGAAAGTGGCTGGTCCCACTACTACTATTACGGTATGGACG
TCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA

SEQ ID NO: 235 (кДНК VH KL2B242)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCC
TGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTATTGGAGCTGGCT
CCGGCAGCCCGCCGGGTCGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTTTATATGTCAGTGGGTT
CACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCTTGTCACTAGACCCGTCCAG
GAACCAGTTGTCCCTGAAACTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTATATTA
TTGTGCGGGAGATAGTGGGAACTACTGGGGTTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAA
CCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 236 (кДНК VH KL2B467)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTTATATCATATGATGGA
AGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTG
TGTATTACTGTGCCCACCTCCCTTATAGTGGGAGCTACTGGGCCTTTGACTACTGGG
GCCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCTTCA

SEQ ID NO: 263 (кДНК VH KL2B494)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTCATTATGCCATGAGCTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTGGTGGTAGTGGTG
GTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAAT

TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGT
ATATTACTGTGCGAAACCTCATATTGTAATGGTGACTGCTCTTCTCTACGACGGTAT
GGACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 237 (кДНК VL m11B6)

GACATTGTGCTGACACAGAGTCCAGCATCCTTGGCAGTATCTTTGGGGCAGC
GGGCAACAATTTCATGCCGTGCATCTGAAAGTGTGGAGTATTTTGGAACTTCTCTTA
TGCACTGGTATCGCCAGAAGCCTGGGCAGCCTCCCAAACTCCTTATATATGCCGCTT
CCAACGTGGAGTCCGGAGTACCAGCACGCTTTTCCGGCTCTGGGTCCGGCACAGACT
TTTCCCTCAATATCCAACCTGTTGAAGAAGACGATTTTTCCATGTATTTTTGCCAACA
GACACGCAAGGTTCCATATACATTCGGCGGCGGCACTAAACTTGAGATCAAA

SEQ ID NO: 238 (кДНК VL hu11B6)

GACATAGTCTTGACTCAGAGCCCGGATTCCCTTGCTGTGTCTCTGGGAGAACG
AGCTACGATCAACTGCAAGGCAAGTGAATCCGTAGAATACTTCGGGACATCATTGA
TGCATTGGTATCAACAGAAACCGGGGCAACCGCCCAAATTGCTGATATATGCGGCT
AGTAATAGAGAATCAGGAGTACCGGATAGGTTTAGTGGTTCAGGATCAGGTACAGA
TTTCACCCTGACAATAAGTAGCTTGCAAGCCGAAGACGTAGCAGTGTATTACTGCCA
ACAAACCCGAAAGGTGCCATATACGTTTGGACAGGGTACAAAGTTGGAAATCAAA

SEQ ID NO: 239 (кДНК VL HCF3-LCD6)

GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGC
GCGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCGAGAGCGTGGAGTACTTCGGCACCAGCCTG
ATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCAAAGCTGCTGATCTACGCTGC
CAGCAACCGCGAGAGCGGCGTGCCAGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCG
ACTTCACCCTGACCATCCAGAGCGTGCAGGCCGAGGACGTCTCCGTGTACTTCTGCC
AGCAGACCCGCAAGGTGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 240 (кДНК VL HCG5-LCB7)

GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGC
GCGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCGAGAGCGTGGAGTACTTCGGCACCAGCCTG
ATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCAAAGCTGCTGATCTACGCTGC
CAGCAACCGCGAGAGCGGCGTGCCAGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCG
ACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGGCCGAGGACGTCGCCGTGTACTACTGCC
AGCAGACCCGCAAGGTGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 241 (кДНК VL KL2B357)

GACATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGACTCTCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAG
AGCCACCATCAACTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGGAATACTTCGGCACCTCTCTGAT
GCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTC
CAACGTGGAATCTGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTT
TACCCTGACCATCAGCTCTCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTTCTGTCAGCA
GACCCGGAAGGTGCCCTACACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAATCAAG

SEQ ID NO: 242 (кДНК VL KL2B358, KL2B359, KL2B360)

GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGA

GAGCCACCCTCTCTTGTAGAGCCTCCGAGTCCGTGGAATACTTCGGCACCTCTCTGA
TGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAGACTGCTGATCTACGCCGCCT
CCAACGTCGAATCTGGCATCCCCGCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACAGACT
TTACCCTGACCATCTCCTCCGTGGAACCCGAGGATTTCGCTGTGTACTTTTGCCAGCA
GACCCGGAAGGTGCCCTACACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAATCAAG

SEQ ID NO: 243 (кДНК VL KL2B413)

GAAATCGTACTGACCCAGTCCCCTTCTTTCTTGAGTGCATCAGTTGGGGATAG
AGTGACCATTACTTGTAGAGCATCTCAAGGTATTTCTTCATACTTGTCTTGGTATCAA
CAAAAACCTGGCAAGGCACCCAAACTCTTGATCTACGCCACCTCTACATTGCAAAGT
GGGGTTCCTTCTAGGTTTTCAGGCTCCGGCTCTGGTACCGAGTTCACCCTCACTATAA
GCAGTCTCCAACCTGAAGATTTCGCTACTTATTATTGTCAGCAGCTTAATTCTTATCC
CCGAACCTTTGGTCAAGGAACTAAGGTCGAGATCAAA

SEQ ID NO: 244 (кДНК VL KL2B30)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCA
GCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAG
TGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAAT
CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGCTTAATAGTTA
CCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

SEQ ID NO: 245 (кДНК VL KL2B53)

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCA
GCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGTTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCACTC
TGGGGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT
CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAAGTATAACAGTGC
CCCGTACACTTTTGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

SEQ ID NO: 246 (кДНК VL KL2B242)

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGAGAGACAG
CCAGCATCACCTGCTCTGGAGATCAATTGGGGGAAAATTATGCTTGCTGGTATCAGC
AGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGTTGGTCATCTATCAAGATAGTAAGCGGCCCTCAG
GGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCA
GCGGGACCCAGGCTCTGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACAACAGT
ATTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

SEQ ID NO: 247 (кДНК VL KL2B467)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCCGGGCAGACGG
CCAGTATTACCTGTGGGGGAGACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAG
CAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATAATAGCGACCGGCCCTC
AGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGACCACGGCCACCCTGACCAT
CAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTA
GTAGTGATCATCCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTA

SEQ ID: 271 (ДНК LC KLK2B494_VL)

TCTTCTGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACGG
CCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAG
CAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATGATAGCGACCGGCCCTC
AGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCAT
CAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTA
GTAGTGATCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

Консенсусные последовательности VH и VL

На ФИГ. 1 показано выравнивание последовательностей доменов VH mu11B6, hu11B6, KL2B357, KL2B358, KL2B359, KL2B360, HC3 и HCG5. На ФИГ. 2 показано выравнивание последовательностей доменов VL mu11B6, hu11B6, KL2B357, KL2B358, KL2B359, KL2B360, LD6 и LCB7. Консенсусную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO:74 определяли для доменов VH и VL, соответственно. Остатки HCDR и LCDR выделены подчеркиванием.

SEQ ID NO: 75

QVQLQESGPGLVKPSX_1TLSLTCX_2VSGNSITSDYAWNWIRQX_3PGKX_4LEWX_5GY
ISYSGSTT

YNPSLKSRVTX$_6$SRDTSKNQFSLKLSSVTX$_7$X$_8$DTAVYYCATGYYYGSGFWGQGT
LVTVSS

где X_1 представляет собой D или Q; X_2 представляет собой A или T; X_3 представляет собой P или F; X_4 представляет собой G или R; X_5 представляет собой I или M; X_6 представляет собой I или M; X_7 представляет собой A или P; X_8 представляет собой V или A.

SEQ ID NO: 74

X_1IVLTQSPX$_2$X$_3$LX$_4$X$_5$SX$_6$GERATX$_7$X$_8$CX$_9$ASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPX$_1$
$_0$LLIYAASNX$_{11}$

ESGX$_{12}$PX$_{13}$RFSGSGSGTDFTLTIX$_{14}$SX$_{15}$X$_{16}$QX$_{17}$EDX$_{18}$X$_{19}$VYX$_{20}$CQQTRKVPYTF
GX$_{21}$GTKX$_{22}$EIK

где X $_1$ представляет собой D или E; X_2 представляет собой D или A; X_3 представляет собой S или T; X_4 представляет собой A или S; X_5 представляет собой V или L; X_6 представляет собой L или P; X_7 представляет собой I, V или L; X_8 представляет собой N или S; X_9 представляет собой R или K; X_{10} представляет собой K или R; X_{11} представляет собой V или M; X_{12} представляет собой V или I; X_{13} представляет собой A или D; X_{14} представляет собой O или S; X_{15} представляет собой L или V; X_{16} представляет собой Q или E; X_{17} представляет собой P или A; X_{18} представляет собой F или V; X $_{19}$ представляет собой A или S, X $_{20}$ представляет собой Y или F; X_{21} представляет собой Q или G; и X_{22} представляет собой L или V

Fab-Fc и scFv

Специфические области VH/VL hK2 конструировали как VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3 и VL-CL и экспрессировали как IgG2 или IgG4 или конструировали как

scFv в ориентации VH-линкер-VL или VL-линкер-VH. Линкер, используемый в scFv, представлял собой линкер SEQ ID NO: 7, описанный выше. ScFv использовали для получения биспецифических антител, как описано в примере 7, или с получением CAR, как описано в примере 11.

В **таблице 10** приведены аминокислотные последовательности выбранных антител к hK2 в формате мАт. В **таблице 11** приведены аминокислотные последовательности LC выбранных антител к hK2 в мАт. В **таблице 12** приведен сводный обзор HC и LC ДНК SEQ ID NO выбранных антител к hK2 в формате мАт. В **таблице 13** показаны аминокислотные последовательности выбранных scFv в ориентациях VH-линкер-VL или VL-линкер-VH.

Таблица 10 Аминокислотная последовательность HC (VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3) выбранных антител к hK2 в формате мАт.

HK2 ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ	БЕЛОК HC, SEQ ID NO:	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ HC
m11B6_HC	202	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWNWIRQ FPGNRLEWMGYISYSGSTTYSPSLKSRFSITRDTSKNQFFL QLNSVTPEDTATYFCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSAKT TAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNS GSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNV AHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIF PPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEV HTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV NNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVT LTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGS YFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFS RTPGK
h11B6_HC	203	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQ PPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSL KLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK

		NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
KL2B30_HC	210	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPP GKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTT VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK
K2B53_HC	211	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQA PGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMDSLRVEDSAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGT MVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK
KL2B242_HC	212	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQP AGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSL KLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE

		YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK
KL2B467_HC	213	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQ APGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
KL2B494_HC	219	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQ APGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWG QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Таблица 11. Аминокислотные последовательности LC (VL-CL) выбранных антител к hK2 в формате мАт (Fab-Fc).

НК2 ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ	БЕЛОК LC SEQ ID NO:	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ LC
m11B6_LC	214	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYFGTSLMHW YRQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLN

		IQPVEEDDFSMYFCQQTRKVPYTFGGGTKLEIKRADAA PTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKID GSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
h11B6_LC	215	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHW YQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
KL2B30_LC	221	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQK PGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP EDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
KL2B53_LC	222	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQ KPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
KL2B242_LC	223	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQK PGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQ ALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
KL2B467_LC	224	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQK PGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

KL2B494_LC	220	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Таблица 12. SEQ ID NO последовательностей кДНК HC и LC выбранных антител к hK2

Антитело	Белок HC SEQ ID NO:	Белок LC SEQ ID NO:	кДНК HC с SEQ ID NO:	кДНК LC с SEQ ID NO:
m11B6	202	214	284	296
hu11B6	203	215	285	297
KL2B30	210	221	292	450
KL2B53	211	222	293	451
KL2B242	212	223	294	305
KL2B467	213	224	295	306
KL2B494	219	220	274	282

SEQ ID NO: 284 (кДНК HC m11B6)

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCTGGACCCGGACTTGTTAAACCAAGTCAGTCTC
TGTCCCTGACCTGTACCGTCACCGGCAACAGCATCACAAGCGATTACGCATGGAACT
GGATCAGGCAGTTCCCTGGAAATCGACTCGAATGGATGGGCTACATTTCATACTCCG
GTTCAACCACTTACTCTCCATCCTTGAAATCTAGGTTCAGCATCACCCGTGATACCTC
AAAGAACCAATTTTTTCTGCAACTGAATAGCGTAACTCCAGAGGACACAGCCACAT
ATTTCTGCGCCACTGGGTATTACTATGGCTCAGGTTTCTGGGGTCAGGGCACTCTCG
TCACCGTCAGCAGCGCCAAAACAACAGCACCAAGTGTCTATCCACTGGCCCCTGTGT
GTGGAGATACAACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGTCAAGGGTTATTTCC
CTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCACACCT
TCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTGACTGTAACCT
CGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCCACCCGGCAAGCAGC
ACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCC
ATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCC
AAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGT
GGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGG
AAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGG
GTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAA
ATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAAC
CCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAG

ATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACCGACTTCATGCCTGAAGAC
ATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGA
ACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAA
GAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGC
ACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 285 (кДНК HC hu11B6)

CAGGTCCAACTGCAAGAGAGCGGACCGGGCCTGGTAAAGCCATCCGACACA
TTGTCCCTGACGTGTGCGGTAAGTGGAAACTCTATCACTAGCGACTATGCGTGGAAT
TGGATAAGACAACCGCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGATAGGATATATCAGCTATTC
CGGTTCTACGACATACAATCCTTCCCTGAAAAGCAGAGTCACTATGTCACGCGACAC
GTCCAAGAATCAGTTCTCATTGAAATTGTCATCCGTAACGGCCGTTGACACTGCGGT
TTATTATTGCGCAACCGGATATTACTACGGCTCTGGTTTTTGGGGACAGGGAACACT
TGTTACTGTTAGTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC
TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT
CCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA
CCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACA
TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT
GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA
CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA
GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC
CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT
GGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 292 (кДНК HC KL2B30)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCC
TGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGAT
CCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGATATATCTATTACAGTGGGA
GCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCA
AGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATT
ACTGTGCGGGGACTACGATTTTTGGAGTGGTTACCCCCAACTTCTACTACGGTATGG
ACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCAT
CCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGG
GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGC

GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTACACT
TGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAA
ATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAG
TCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
TCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG
TACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTT
CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA
CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCC
CCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG
CTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA
ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCA
GGCTAACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTG
ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT
AAA

SEQ ID NO: 293 (кДНК HC KL2B53)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTATGACATACACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATTTCATATGATGGA
AGTAAAAAAGACTATACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGTTGAGGACTCGGCTG
TGTATTCCTGTGCGAGAGAAAGTGGCTGGTCCCACTACTACTATTACGGTATGGACG
TCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCG
TCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCC
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTACACTTGC
AACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATA
TGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTT
CCTGTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
GTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG
TGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAAC
AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAAC
CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
CCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA
CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCT
AACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC

ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA

SEQ ID NO: 294 (кДНК HC KL2B242)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCC
TGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTATTGGAGCTGGCT
CCGGCAGCCCGCCGGGTCGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTTTATATGTCAGTGGGTT
CACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCTTGTCACTAGACCCGTCCAG
GAACCAGTTGTCCCTGAAACTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTATATTA
TTGTGCGGGAGATAGTGGGAACTACTGGGGTTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAA
CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCC
CTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG
CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG
ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTACACTTGCAACGTAGATCACAA
GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCC
CACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAA
AACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGG
ACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGT
GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGAT
GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACA
TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT
CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAG
AGCAGATGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA

SEQ ID NO: 295 (кДНК HC KL2B467)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTTATATCATATGATGGA
AGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTG
TGTATTACTGTGCCCACCTCCCTTATAGTGGGAGCTACTGGGCCTTTGACTACTGGG
GCCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG
TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACC
AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG
AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA
CAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAG

TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
TCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG
AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC
AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT
GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG
TAAA

SEQ ID NO: 274 (кДНК HC KL2B494)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTCATTATGCCATGAGCTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTGGTGGTAGTGGTG
GTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAAT
TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGT
ATATTACTGTGCGAAACCTCATATTGTAATGGTGACTGCTCTTCTCTACGACGGTAT
GGACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCC
TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAG
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA
TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
AAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCCGG
GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG
GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA
AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG
CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG
TACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT
TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC
CTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 296 (кДНК LC mu11B6)

GACATTGTGCTGACACAGAGTCCAGCATCCTTGGCAGTATCTTTGGGGCAGC

GGGCAACAATTTCATGCCGTGCATCTGAAAGTGTGGAGTATTTTGGAACTTCTCTTA
TGCACTGGTATCGCCAGAAGCCTGGGCAGCCTCCCAAACTCCTTATATATGCCGCTT
CCAACGTGGAGTCCGGAGTACCAGCACGCTTTTCCGGCTCTGGGTCCGGCACAGACT
TTTCCCTCAATATCCAACCTGTTGAAGAAGACGATTTTTCCATGTATTTTTGCCAACA
GACACGCAAGGTTCCATATACATTCGGCGGCGGCACTAAACTTGAGATCAAACGGG
CTGATGCTGCACCGACTGTGTCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTG
GAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCA
AGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGAT
CAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGGA
CGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTT
CACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT

SEQ ID NO: 297 (кДНК LC hu11B6)

GACATAGTCTTGACTCAGAGCCCGGATTCCCTTGCTGTGTCTCTGGGAGAACG
AGCTACGATCAACTGCAAGGCAAGTGAATCCGTAGAATACTTCGGGACATCATTGA
TGCATTGGTATCAACAGAAACCGGGGCAACCGCCCAAATTGCTGATATATGCGGCT
AGTAATAGAGAATCAGGAGTACCGGATAGGTTTAGTGGTTCAGGATCAGGTACAGA
TTTCACCCTGACAATAAGTAGCTTGCAAGCCGAAGACGTAGCAGTGTATTACTGCCA
ACAAACCCGAAAGGTGCCATATACGTTTGGACAGGGTACAAAGTTGGAAATCAAAC
GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
CTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACA
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAA
AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA
GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 450 (кДНК LC KL2B30)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCA
GCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAG
TGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAAT
CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGCTTAATAGTTA
CCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCAC
CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGT
TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG
ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA
ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA
AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 451 (кДНК LC KL2B53)

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCA

GCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGTTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCACTC
TGGGGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT
CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAAGTATAACAGTGC
CCCGTACACTTTTGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGTACGGTGGCTGCAC
CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGT
TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG
ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA
ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA
AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 305 (кДНК LC KL2B242)

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGAGAGACAG
CCAGCATCACCTGCTCTGGAGATCAATTGGGGGAAAATTATGCTTGCTGGTATCAGC
AGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGTTGGTCATCTATCAAGATAGTAAGCGGCCCTCAG
GGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCA
GCGGGACCCAGGCTCTGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACAACAGT
ATTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGC
ACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCAC
ACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGC
CGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCA
ACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCC
CACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAG
TGGCCCCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO: 306 (кДНК LC KL2B467)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCCGGGCAGACGG
CCAGTATTACCTGTGGGGGAGACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAG
CAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATAATAGCGACCGGCCCTC
AGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGACCACGGCCACCCTGACCAT
CAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTA
GTAGTGATCATCCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGGTCAGC
CCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCA
ACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTG
GCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTC
CAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGC
AGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTG
GAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO: 282 (кДНК LC KL2B494)

TCTTCTGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACGG
CCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAG
CAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATGATAGCGACCGGCCCTC

AGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCAT
CAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTA
GTAGTGATCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCC
AAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAAC
AAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCC
TGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAA
ACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGT
GGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG
AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

Таблица 13. Аминокислотные последовательности вариабельного домена выбранных антител scFv к hK2 в формате VH-линкер-VL (HL) или VL-линкер-VH (LH).

Название scFv	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
scFv1	HCG5_LDC6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISR DTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFW GQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQS PDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQ KPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI QSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	8
scFv2	HCG5_hu11B6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISR DTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFW GQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQS PDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQ KPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	9
scFv3	HCF3_hu11B6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRD TSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWG QGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSP DSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQK PGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS VQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	10
scFv4	HCG5_LCB7_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISR	11

		DTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFW GQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQS PDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQ KPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	
scFv5	LCD6_HCG5_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLE IKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPS DTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMG YISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTP VDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	12
scFv6	hu11B6_HCF3_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLE IKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPS DTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGY ISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPV DTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	13
scFv7	hu11B6_HCG5_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLE IKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPS DTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMG YISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTP VDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	14
scFv8	LCB7_HCF3_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLE IKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPS DTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGY ISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPV DTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	15
scFv9	LCB7_HCG5_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGT	16

		DFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLE IKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPS DTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMG YISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTP VDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	
scFv10	LCD6_HCF3_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLE IKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPS DTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGY ISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPV DTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	17
scFv11	hu11B6_LCB7_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSR DTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFW GQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQS PDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQ KPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	18
scFv12	hu11B6_LCD6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSR DTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFW GQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQS PDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQ KPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI QSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	19
scFv13	hu11B6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSR DTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFW GQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQS PDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQ KPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	20
scFv14	LCD6_hu11B6_L	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGT	21

	H	DFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLE IKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPS DTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGY ISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTA VDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	
scFv15	hu11B6_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLE IKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPS DTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGY ISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTA VDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	22
scFv16	LCB7_hu11B6_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLE IKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPS DTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGY ISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTA VDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	23
scFv17	KL2B413_HL	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMT WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDIL TGHYGMDVWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKS TGGSEIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLS WYQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIK	133
scFv18	KL2B413_LH	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSWYQ QKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIKGGSE GKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQD GSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDQNYDILTGHYGMDVWGQGTTVTVS S	134
scFv19	KL2B359_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWN	135

		WIRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWG QGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSP ATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKP GQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSV EPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	
scFv20	KL2B359_LH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGT DFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEI KGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPS QTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKRLEWIGY ISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	136
scFv21	KL2B357_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWG QGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSP DSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSLMHWYQQK PGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	318
scFv22	KL2B357_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVE IKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPS QTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGY ISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	319
scFv23	KL2B358_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWN WIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWG QGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSP ATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKP GQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSV EPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	320
scFv24	KL2B358_LH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLM	321

		HWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGT DFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEI KGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPS QTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGY ISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	
scFv25	KL2B360_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWG QGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSP ATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKP GQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSV EPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	322
scFv26	KL2B360_LH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLM HWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGT DFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEI KGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPS QTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGY ISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	323
scFv27	KL2B467_HL	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMH WVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSY WAFDYWGQGTQVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGG SQSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWY QQKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTAT LTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKV TV	324
scFv28	KL2B467_LH	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQ QKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATL TISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVT VGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWV AFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVT	325

		VSS	
scFv39	KL2B494_HL	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMS WVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVT ALLYDGMDVWGQGTMVTVSS GGSEGKSSGSGSESKSTGGSSSELTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSD RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV WDSSSDHVVFGGGTKLTVL	308
scFv40	KL2B494_LH	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQ QKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATL TISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTV LGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVST IGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWGQGT MVTVSS	316
scFv41	KL2B30_HL	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWI RQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYY GMDVWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGS DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWY QQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK	404
scFv42	KL2B30_LH	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWY QQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIKGGS EGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGST NYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSS	405
scFv43	KL2B53_HL	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHW VRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMDSLRVEDSAVYSCARESGWSHYY YYGMDVWGQGTMVTVSSGGSEGKSSGSGSESKST	406

		GGSDIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLA WYQQKPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGTRLEIK	
scFv44	KL2B53_LH	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWY QQKPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGTRLEIKGG SEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAIISYD GSKKDYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMDSLRVE DSAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMVTVS S	407
scFv45	KL2B242_HL	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSW LRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLD PSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWF DPWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSSYE LTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKP GQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT QALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVL	408
scFv46	KL2B242_LH	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQ QKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVLGGS EGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGF TNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAV YYCAGDSGNYWGWFDPWGQGTLVTVSS	409

Пример 3. Определение биофизических характеристик антител к hK2

Аффинность и термостабильность антител к hK2.

Аффинность выбранных антител к hK2 к растворимому hK2 измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). SPR представляет собой способ изучения силы взаимодействия между двумя партнерами по связыванию без использования меток путем измерения изменения массы при формировании и диссоциации комплекса. Антитела захватывали на чипе датчика, покрытом антителом к Fc, с последующей инъекцией растворимого hK2 в различных концентрациях, и определяли время ассоциации и диссоциации. После диссоциации поверхность восстанавливали подходящим раствором для подготовки к следующему взаимодействию. Кинетическую информацию (константы скорости ассоциации и диссоциации) экстрагировали путем

подбора сенсограмм к модели связывания Ленгмюра в соотношении 1 : 1. Аффинность связывания (K_D) регистрировалась как отношение констант скорости ($k_{диссоциации}/k_{ассоциации}$). Значения K_D выбранных антител hK2 перечислены в **таблице 14.**

Термостабильность определяли с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (NanoDSF) с использованием автоматического прибора Prometeus. NanoDSF использовали для измерения $T_м$ молекул в концентрации 0,5 мг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7,4. Измерения проводили путем загрузки образцов в 24-капиллярную матрицу из 384-луночного планшета для образцов. Для каждого образца выполняли повторные измерения. Термическое сканирование образов охватывает диапазон от 20°C до 95°C со скоростью 1,0°C/мин. Флуоресценцию интактного триптофана и тирозина мониторили при длинах волн излучения 330 нм и 350 нм, а соотношение F350/F330 нм наносили на график зависимости от температуры для создания кривых разворачивания белка. Измеренные значения Tm перечислены в **таблице 14.**

Таблица 14. K_D и Tm выбранных молекул

Молекула	K_D (нМ)	Tm (°C)
KL2B413 (scFv-LH-Fc)	34,3	67
KL2B359 (scFv-LH-Fc)	0,7-1	67
KL2B30 (Fab)	0,460	> 70
KL2B242 (Fab)	0,040	> 70
KL2B53 (Fab)	0,080	> 70
KL2B467 (Fab)	0,078	> 70
KL2B494 (Fab)	0,053	> 70

scFv KL2B413, полученный в результате кампании иммунизации мышей линии Abblexis, имел термостабильность (Tm) 67°C, измеренную с помощью Nano DSF, и аффинность связывания (K_D) с hK2 человека около 34 нМ. Клон KL2B359, полученный для проведения повторной гуманизации и который сохранял аффинность связывания, аналогичную мышиному 11B6, преобразовали в scFv-Fc и CAR-T для дополнительного профилирования. ScFv KL2B359 показывает значения Tm 67°C и аффинности связывания (K_D) с hK2 ~0,7 нМ-1 нМ. KL2B30, KL2B242, KL2B53, KL2B467 и KL2B494 Fab демонстрировали показатели аффинности связывания менее 0,5 нМ, а значения Tm выше 70°C.

Картирование эпитопов

Эпитоп и паратоп выбранных антител к hK2 и биспецифических антител к hK2/CD3 определяли методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HX-MS). Для эксперимента по картированию эпитопа и паратопа использовали антиген KLK2 человека.

Вкратце, очищенный антиген KLK2 инкубировали с антителами к hK2 и без них

или биспецифическими антителами к hK2/CD3 в буфере для мечения оксидом дейтерия. Смесь, полученную в результате водородно-дейтериевого обмена (HDX), гасили в разные моменты времени путем добавления 8 М мочевины, 1М TCEP, pH 3,0. Гашенный образец пропускали через колонку с иммобилизованным пепсином/FPXIII при 600 мкл/мин, уравновешенную буфером А (1% ацетонитрил, 0,1% МК в H2O) при комнатной температуре. Пептические фрагменты загружали в обращенно-фазную предколонку при концентрации 600 мкл/мин с буфером А и обессоливали в течение 1 мин (600 мкл буфера А). Обессоленные фрагменты разделяли с помощью колонки C18 с линейным градиентом от 8% до 35% буфера В (95% ацетонитрила, 5% H2O, 0,0025% TFA) при 100 мкл/мин в течение 20 мин и анализировали методом масс-спектрометрии. Анализы методом масс-спектрометрии проводили с использованием масс-спектрометра LTQ™ Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific) с температурой капилляра 275 °C, разрешением 150 000 и диапазоном масс (масса/заряд) 300-1800. Приложение BioPharmma Finder 3.0 (Thermo Fisher Scientific) использовали для идентификации пептидов недейтерированных образцов перед проведением экспериментов HDX. Для экстракции значений центроидов из MS файлов необработанных данных для проведения экспериментов HDX использовали программу HDExaminer версии 2.5 (Sierra Analytics, г. Модесто, штат Калифорния).

Инкубация антител hK2, hu11B6, KL2B494, KL2B467, KL2B30, KL2B413 и KL2B53 с растворимым белком hK2 приводила к различным паттернам водородного обмена и общего уровня защиты. Для визуализации связывающих эпитопов защищенные сегменты сопоставляли с последовательностью антигена hK2 (**ФИГ. 3**). KL2B494, KL2B467 и KL2B30, связанные с общими последовательностями (i) остатков 174-178 (**SEQ ID NO: 111**, KVTEF) (например, KL2B494, KL2B467 и KL2B30, связанные по меньшей мере с тремя остатками SEQ ID NO: 111, а именно остатки KVT 174-176) и (ii) остатки 230-234 (**SEQ ID NO: 112**, HYRKW) (например, KL2B494, KL2B467 и KL2B30, связанные по меньшей мере с тремя остатками SEQ ID NO: 112, а именно остатками HYR в 230-232). KL2B413 также связывают все остатки SEQ ID NO: 111 и остатки KW SEQ ID NO: 112, как показано на **ФИГ. 3**. В одном варианте осуществления настоящего изобретения также предложен выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, причем указанный антигенсвязывающий домен связывается с hK2 в эпитопах, имеющих последовательности SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 112; например, указанный антигенсвязывающий домен связывает все остатки или по меньшей мере четыре остатка или по меньшей мере три остатками SEQ ID NO: 111 и связывает все остатки или по меньшей мере четыре остатка или по меньшей мере три остатка SEQ ID NO: 112.

KL2B53 показал другой характер защиты и был связан с последовательностью, состоящей из остатков 27-32 (SEQ ID NO: **113**, SHGWAH), 60-75 (**SEQ ID NO: 114**, RHNLFEPEDTGQRVP) и 138-147 (**SEQ ID NO: 115**, GWGSIEPEE).

В соответствии с вариантом осуществления выделенный белок антитела к hK2/CD3 (например, hu11B6, KL2B494, KL2B467, KL2B30, KL2B413 или KL2B53) содержит hK2-

специфичный антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с диспергированным эпитопом (т. е., с эпитопами, остатки которых отдаленно расположены в последовательности) hK2, содержащим одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 111, 112, 113, 114, и 115.

Паратоп антител к hK2 hu11B6, KL2B494, KL2B467, KL2B413 и биспецифических антител к hK2/CD3 KLCB113 и KLCB80 идентифицировали на основании существенных различий в поглощении дейтерия на графиках остатков, созданных программой HDExaminer. KL2BB494 содержит три области паратопа, две из которых расположены в вариабельном домене тяжелой цепи KL2B494 (GFTFSH (SEQ ID NO: 455) и TAVYYCAKPHIVMVTAL (SEQ ID NO: 456), а одна область паратопа расположена в вариабельном домене легкой цепи (YDDSDRPSGIPER (SEQ ID NO: 457)). KL2BB467 содержит три области паратиопа, две из которых расположены в вариабельном домене тяжелой цепи KLKL2B467 (FTFSY (SEQ ID NO: 458) и GSYWAFDY (SEQ ID NO: 459), а одна область паратопа расположена в вариабельном домене легкой цепи (DNSD (SEQ ID NO: 460)). Hu11B6 содержит одну область эпитопа, расположенную в тяжелой цепи (GNSITSDYA (SEQ ID NO: 461)). KL2B413 содержит две области паратопа, расположенные в вариабельном домене тяжелой цепи (GFTF (SEQ ID NO: 462) и ARDQNYDIL (SEQ ID NO: 463)). KL2B30 биспецифического KLCB80 содержит область паратопа, расположенную в тяжелой цепи (содержащей аминокислотные остатки TIF и VTPNF (SEQ ID NO: 464), и области паратопа, расположенную в легкой цепи (YAASTLQSG (SEQ ID NO: 465)). KL2B53 биспецифического KLCB113 содержит одну область паратопа, расположенную в тяжелой цепи (содержащей аминокислотные остатки ESGWSHY (SEQ ID NO: 466)). На **ФИГ. 38A-38F** показан связывающий паратоп этих антител к hK2 и биспецифических антител к hK2/CD3 (подчеркнутые последовательности указывают области CDR, а выделенные последовательности указывают на области паратопов).

Пример 4: Создание антител к CD3

Иммунизация

Создание антитела к CD3 CD3B376 было описано в документе US20200048349.

Антитела к CD3 получали с использованием трансгенных мышей линии Ablexis. Мышей линии Abblexis иммунизировали TRCW5 (**SEQ ID NO: 338**), включая 13 мышей Kappa и 12 мышей Lambda. TRCW5 состоит из внеклеточной области CD3,δ слитого из 26 аминокислот, с внеклеточным участком CD3 ε как указано в Kim et al, JMB (2000) 302 (4): 899-916. Этот полипептид имел на своем С-конце домен Fc IgG1 человека с С-концевой Avi-меткой, используемой для сайт-специфического биотинилирования (Fairhead & Howarth, Methods Mol Biol (2015); 1266: 171-184).

TRCW5 (SEQ ID NO: 338):

FKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDI YKDKESTVQVHYRMGSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGSDGNEEMGGITQTPYK

VSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYV
CYPRGSKPEDANFYLYLRARVSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGKGGGLNDIFEAQKIEWHE

Мышей иммунизировали два раза в неделю в течение 7 недель. На 42-й день мышей иммунизировали для проведения гибридомного слияния путем введения 50 мкг TRCW5 и 50 мкг CD40 мАт, распределенных по 8 местам введения, включая 6 подкожных и 2 внутрикожных инъекций. Для конечной иммунизации мышам вводили 20 мкл клеток Jurkat, Т-клеточную линию, которая эндогенно экспрессирует рецепторный комплекс Т-клеток, включая CD3ε (Schneider et al (1977) Int. J. Cancer, 19 (5): 621-6), при 4,74×107 клеток/мл.

У мышей извлекали лимфатические узлы и селезенки, а слияние проводили по когортам. Клетки лимфатических узлов подсчитывали и объединяли в соотношении 1 : 1 с клетками FO миеломы (ATCC (CRL-1646) и инкубировали в течение 10 дней при 37 °C перед скринингом антител. Затем супернатанты из слитых клеток гибридомы анализировали с помощью твердофазного ИФА на связывание с TRCW5 с использованием TRCW5, в том числе неспецифически иммобилизованного на планшете (ELISA, Thermo, кат. № 34022), или путем конъюгации стрептавидина с биотинилированным TRCW5 (SPARCL ELISA, Lumigen), в соответствии с инструкциями производителя. Твердофазный ИФА проводили с помощью планшета, покрытого 0,5 мкг/мл TRCW5 и 0,5 мкг/мл HVEM-Fc (R&D, кат. № 365-HV) в течение ночи при 4 °C. Планшеты блокировали добавлением 0,4% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина (БСА) в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение ночи при 4 °C. Планшеты промывали 1 X PBS с добавлением 0,02% (об./об.) Tween 20. В каждую лунку вносили 50 мкл супернатанта гибридомы и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Связанное антитело обнаруживали путем добавления Fc козьего антитела к мышиному IgG Fc, конъюгированному с пероксидазой хрена (Jackson, кат. № 115-036-071), разбавляли в соотношении 1 : 10 000 в блокирующем буфере с последующей инкубацией в течение 30 мин при комнатной температуре. Субстратный буфер 3, 3′, 5, 5′-тетраметилбензидин (TMB) (Thermo, кат. № 34022) добавляли в количестве 25 мкл/лунку и инкубировали в течение 10 мин в темноте. Реакции останавливали добавлением 4M H_2SO_4 в количестве 25 мкл/лунка. Люминесценцию считывали при 450 нм с помощью микропланшетного фотометра BioTek® Epoch2. Отбирали совпадения, имеющие сигнал по меньшей мере в 3 раза выше, чем фоновый.

Два формата анализа давали 426 совпадений (264 из твердофазного ИФА, 194 из твердофазного ИФА SPARCL, а 70 совпадений были идентифицированы в обоих анализах). Из этих 426 исходных совпадений было подтверждено 49, полученных методом твердофазного ИФА, и 32 полученных методом твердофазного ИФА SPARCL. Гибридные

слияния, соответствующие положительным связующим веществам, провели повторно и исследовали их способность связывать клетки Jurkat методом проточной цитометрии. Результаты предполагают, что три антитела, включая клон 003_F12, клон 036_E10 и клон 065_D03, продемонстрировали значительное связывание с клетками Jurkat, эндогенно экспрессирующими CD3, на основании среднего индекса флуоресценции (MFI, см. таблицу 4). Несмотря на подтверждение положительности клонов 003_F12 и 036_E10 (от человека/мышей линии Kappa) для легкой цепи человека/мышей линии Kappa с помощью твердофазного ИФ, клон 065_D03 (от человека/мышей линии Lambda) был отрицательным для линии Lambda человека. Затем вариабельные гены этих трех клонов секвенировали.

Таблица 15. Средний индекс флуоресценции (MFI) для связывания выбранных клонов с клетками Jurkat

№ клона	**MFI (относительные единицы измерения)**
003_F12	176147
036_E10	43133
065_D03	136269
Без Ab	2075.61
10 нМ UCHT1	89214,29

Затем эти три клона подвергали скринингу на способность связывать первичные Т-клетки человека и яванского макака. Вкратце, первичные Т-клетки человека и яванского макака повторно суспендировали в количестве 1 X 10^6 клеток/мл в буфере для окрашивания в потоке и клетки высевали в концентрации 50000 клеток/лунку. В каждую лунку добавляли 50 мкл супернатанта гибридомы и смесь инкубировали на льду в течение 30 мин. После инкубации добавляли 200 мкл окрашивающего буфера и клетки осаждали центрифугированием при 300 X G в течение 5 мин. Мышиное антитело к IgG, конъюгированное с Alexa-647, добавляли в концентрации 2 мкг/мл в буфер для окрашивания общего объема 50 мкл и инкубировали в течение 30 мин на льду. Добавляли 150 мкл окрашивающего буфера, а клетки осаждали центрифугированием при 300 X G в течение 5 мин. Клетки повторно суспендировали в 30 мкл рабочего буфера, содержащего клетки, разбавленные в соотношении 1 : 1000 с помощью зеленого красителя для окрашивания мертвых клеток Sytox, и проанализировали на платформе iQue Screener. Клетки гейтировали на FCS/SCS для удаления детрита. Синглеты гейтировали на SCS-A/SCS-H и из популяции синглетов гейтировали и выбирали живые клетки на канале с использованием BL1 канала для низкого-отрицательного зеленого окрашивания Sytox. Связывание CD3 оценивали путем сравнения исследуемых препаратов с отрицательным контролем с помощью геометрического среднего RL1 (Alexa-647). В этом анализе клон 065_D03 продемонстрировал самый высокий сигнал связывания с клетками (**ФИГ. 4А** и **ФИГ. 4В).**

Затем вариабельную область клона 065_D03 клонировали в каркас IgG1, в

результате чего антитело стало называться CD3B815 (последовательности показаны в **таблице 16**). Проведенный повторный скрининг CD3B815 на связывание с клетками Jurkat продемонстрировал положительное связывание с клетками Jurkat.

Таблица 16. Аминокислотные последовательности CD3B815.

Белок	SEQ ID NO:	Аминокислотные последовательности
CD3B815 Тяжелая цепь	262	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQ APGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSL DLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
CD3B815 Легкая цепь	265	DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRTNG SPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESEDIADY YCQQSNSWPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

Гуманизация и форматирование scFv CD3-связывающих доменов

Легкую цепь (LC) v-области CD3B815 гуманизировали в формате scFv. Вкратце, LC из CD3B815 был привит на зародышевую линию IGKV 1-39*01-IGKJ2*01 человека, и были идентифицированы две позиции (Y49K и L78V) обратных мутаций человек-мышь. В результате получили варианты с позициями Y49K или L78 V или с обеими из них. LC из CD3B815 также содержала мотив NS, который повышает вероятность дезамидирования в положениях 92-93. Таким образом, несколько полученных вариантов также содержали N92G. Эти варианты и связанные с ними мутации описаны в **Таблице 17**.

Таблица 17. Мутации в гуманизированных вариантах scFv, определенные в соответствии с номенклатурой Кэбота.

Идентификация	**Описание**	**Мутации VL**

scFv		
CD3W234	CD3B815-HL-scFV, содержит VL мыши	нет
CD3W238	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	нет
CD3W241	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	L78V
CD3W242	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	Y49K
CD3W243	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	Y49K, L78V
CD3W244	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	L78V, N92G
CD3W245	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	Y49K, N92G
CD3W246	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	Y49K, L78V, N92G
CD3W247	CDR CD3B815, привитая в IGKV1D-39*01	N92G
CD3W248	CD3B815-HL-scFV, содержит VL мыши	N92G

В **таблице 18** приведены аминокислотные последовательности VH и VL выбранных антител к CD3. В **таблице 19** приведены последовательности ДНК VH и VL выбранных антител к CD3. В **таблице 20** приведены аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к CD3 по Кэботу. В **таблице 21** приведены аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбранных антител к CD3 по Кэботу. В таблице 22 обобщены последовательности CDR, VH и VL выбранных антител к CD3. **На ФИГ. 6** показано выравнивание области VL CD3B815, CD3W244, CD3W245, CD3W246 и CD3W247.

Таблица 18. Аминокислотные последовательности VH и VL выбранных вариантов scFv антител CD3.

mAb	Название VH	Последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Название VL	Последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
CD3B815	CD3H488	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSS	248	CD3L372	DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK	249
CD3W244	CD3H488	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYA	248	CD3L394	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYASE	250

		DSVKGRFTFSRDNAK NSLDLQMSGLRAEDT AIYYCTRGWGPFDY WGQGTLVTVSS			SISGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSVQPE DFATYYCQQSGS WPYTFGQGTKLEI K	
CD3W245	CD3H488	EVQLVESGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFSR YNMNWVRQAPGKGL EWVSSISTSSNYIYYA DSVKGRFTFSRDNAK NSLDLQMSGLRAEDT AIYYCTRGWGPFDY WGQGTLVTVSS	248	CD3L395	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRARQ SIGTAIHWYQQKP GKAPKLLIKYASE SISGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQSGS WPYTFGQGTKLEI K	251
CD3W246	CD3H488	EVQLVESGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFSR YNMNWVRQAPGKGL EWVSSISTSSNYIYYA DSVKGRFTFSRDNAK NSLDLQMSGLRAEDT AIYYCTRGWGPFDY WGQGTLVTVSS	248	CD3L396	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRARQ SIGTAIHWYQQKP GKAPKLLIKYASE SISGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSVQPE DFATYYCQQSGS WPYTFGQGTKLEI K	252
CD3W247	CD3H488	EVQLVESGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFSR YNMNWVRQAPGKGL EWVSSISTSSNYIYYA DSVKGRFTFSRDNAK NSLDLQMSGLRAEDT AIYYCTRGWGPFDY WGQGTLVTVSS	248	CD3L397	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRARQ SIGTAIHWYQQKP GKAPKLLIYYASE SISGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQSGS WPYTFGQGTKLEI K	253
CD3W248	CD3H488	EVQLVESGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFSR YNMNWVRQAPGKGL	248	CD3L398	DILLTQSPGILSVSP GERVSFSCRARQSI GTAIHWYQQRTN	254

		EWVSSISTSSNYIYYA DSVKGRFTFSRDNAK NSLDLQMSGLRAEDT AIYYCTRGWGPFDY WGQGTLVTVSS			GSPRLLIKYASESIS GIPSRFSGSGSGTD FTLTINSVESEDIA DYYCQQSGSWPY TFGGGTKLEIK	
CD3B376	CD3H219	QVQLQQSGPRLVRPS QTLSLTCAISGDSVFN NNAAWSWIRQSPSRG LEWLGRTYYRSKWL YDYAVSVKSRITVNP DTSRNQFTLQLNSVTP EDTALYYCARGYSSS FDYWGQGTLVTVSS	122	CD3L150	QSALTQPASVSGS PGQSITISCTGTSSN IGTYKFVSWYQQH PDKAPKVLLYEVS KRPSGVSSRFSGSK SGNTASLTISGLQA EDQADYHCVSYA GSGTLLFGGGTKL TVL	123

Таблица 19. Последовательности нуклеиновых кислот VH и VL гуманизированных вариантов scFv.

Название связывающего домена	Нуклеотидная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
CD3B815	GAGGTGCAACTGGTGGA GTCTGGGGGAGGCCTGG TCAAGCCTGGGGGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCTGGATTCACCTT CAGTAGATATAACATGA ACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGA GTGGGTCTCATCCATTA GTACTAGTAGTAATTAC ATATACTACGCAGACTC AGTGAAGGGCCGATTCA CCTTCTCCAGAGACAAC GCCAAGAACTCACTGGA TCTGCAAATGAGCGGCC	273	GATATACTTCTTACCCAGA GTCCCGGCATCCTCTCCGT TAGCCCTGGGGAGAGAGT CTCATTCTCATGCCGAGCC AGACAGTCAATTGGTACCG CAATACACTGGTATCAACA GCGGACCAATGGTTCTCCC CGACTTCTGATAAAGTACG CATCAGAATCAATTAGTGG AATACCATCAAGATTTAGT GGCTCAGGGAGTGGAACC GATTTTACTCTGACCATCA ACTCAGTGGAATCTGAGGA CATTGCCGACTACTACTGT CAACAAAGCAATAGTTGG	276

	TGAGAGCCGAGGACACG GCTATTTATTACTGTACG AGAGGCTGGGGGCCTTT TGACTACTGGGGCCAGG GAACCCTGGTCACCGTC TCCTCA		CCATATACCTTCGGAGGCG GAACTAAATTGGAGATAA AA	
CD3W244	GAGGTGCAACTGGTGGA GTCTGGGGGAGGCCTGG TCAAGCCTGGGGGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCTGGATTCACCTT CAGTAGATATAACATGA ACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGA GTGGGTCTCATCCATTA GTACTAGTAGTAATTAC ATATACTACGCAGACTC AGTGAAGGGCCGATTCA CCTTCTCCAGAGACAAC GCCAAGAACTCACTGGA TCTGCAAATGAGCGGCC TGAGAGCCGAGGACACG GCTATTTATTACTGTACG AGAGGCTGGGGGCCTTT TGACTACTGGGGCCAGG GAACCCTGGTCACCGTC TCCTCA	273	GACATCCAGATGACACAGT CACCTTCTAGTTTGTCTGCT TCTGTAGGCGACCGTGTAA CTATCACCTGTCGAGCCCG TCAAAGTATTGGTACTGCC ATTCACTGGTACCAACAAA AACCTGGCAAAGCTCCAA AACTCTTGATCTACTATGC CTCCGAAAGCATATCAGGG GTCCCAAGCAGATTCTCAG GCAGTGGCAGTGGCACTG ACTTCACTCTCACCATTTCT AGCGTGCAACCAGAGGAC TTCGCCACTTATTACTGCC AACAGTCAGGGAGCTGGC CCTACACCTTCGGCCAAGG TACAAAACTGGAGATCAA A	277
CD3W245	GAGGTGCAACTGGTGGA GTCTGGGGGAGGCCTGG TCAAGCCTGGGGGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCTGGATTCACCTT CAGTAGATATAACATGA ACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGA	273	GACATACAAATGACACAA TCACCCTCTTCTCTTTCTGC AAGCGTTGGCGACCGTGTC ACTATCACTTGTCGAGCCC GCCAGTCCATAGGTACTGC CATTCACTGGTATCAACAG AAGCCTGGCAAGGCTCCCA AACTCCTGATTAAGTATGC	278

	GTGGGTCTCATCCATTA GTACTAGTAGTAATTAC ATATACTACGCAGACTC AGTGAAGGGCCGATTCA CCTTCTCCAGAGACAAC GCCAAGAACTCACTGGA TCTGCAAATGAGCGGCC TGAGAGCCGAGGACACG GCTATTTATTACTGTACG AGAGGCTGGGGGCCTTT TGACTACTGGGGCCAGG GAACCCTGGTCACCGTC TCCTCA		CAGCGAGAGCATTTCCGGC GTACCTTCAAGATTTTCCG GCTCCGGTAGTGGGACAG ATTTCACTCTCACTATATCT AGCCTCCAACCAGAAGATT TCGCCACTTACTACTGTCA ACAATCAGGTTCATGGCCT TACACTTTCGGCCAGGGGA CAAAATTGGAGATCAAG	
CD3W246	GAGGTGCAACTGGTGGA GTCTGGGGGAGGCCTGG TCAAGCCTGGGGGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCTGGATTCACCTT CAGTAGATATAACATGA ACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGA GTGGGTCTCATCCATTA GTACTAGTAGTAATTAC ATATACTACGCAGACTC AGTGAAGGGCCGATTCA CCTTCTCCAGAGACAAC GCCAAGAACTCACTGGA TCTGCAAATGAGCGGCC TGAGAGCCGAGGACACG GCTATTTATTACTGTACG AGAGGCTGGGGGCCTTT TGACTACTGGGGCCAGG GAACCCTGGTCACCGTC TCCTCA	273	GACATCCAAATGACTCAAT CACCTAGCAGCCTCTCCGC CTCCGTTGGAGATAGAGTG ACAATAACTTGCCGAGCCC GGCAAAGTATCGGAACTG CTATTCACTGGTATCAACA AAAACCTGGAAAGGCACC TAAGCTCTTGATTAAATAC GCTTCTGAGTCCATCTCCG GCGTGCCTTCACGATTCAG CGGCAGCGGTAGTGGTACT GACTTTACCCTCACTATTA GTTCTGTTCAGCCAGAGGA CTTCGCAACTTATTACTGC CAACAGAGTGGTTCCTGGC CATACACTTTTGGCCAGGG GACTAAATTGGAAATCAA A	279

CD3W247	GAGGTGCAACTGGTGGA GTCTGGGGGAGGCCTGG TCAAGCCTGGGGGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCTGGATTCACCTT CAGTAGATATAACATGA ACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGA GTGGGTCTCATCCATTA GTACTAGTAGTAATTAC ATATACTACGCAGACTC AGTGAAGGGCCGATTCA CCTTCTCCAGAGACAAC GCCAAGAACTCACTGGA TCTGCAAATGAGCGGCC TGAGAGCCGAGGACACG GCTATTTATTACTGTACG AGAGGCTGGGGGCCTTT TGACTACTGGGGCCAGG GAACCCTGGTCACCGTC TCCTCA	273	GACATCCAAATGACTCAAA GCCCCTCTAGTTTGAGTGC ATCTGTAGGTGACCGGGTA ACAATCACCTGCCGTGCCC GGCAAAGTATAGGTACTGC AATCCACTGGTACCAGCAA AAACCCGGCAAAGCACCA AAGCTGCTCATATACTATG CTAGTGAGAGCATTTCTGG CGTTCCTAGTCGATTTTCT GGATCAGGGAGTGGAACT GATTTTACACTGACAATCA GCAGCCTCCAACCCGAAG ACTTCGCCACCTACTATTG TCAGCAGTCTGGGTCCTGG CCTTACACATTCGGTCAAG GAACTAAATTGGAGATCA AA	280
CD3W248	GAGGTGCAACTGGTGGA GTCTGGGGGAGGCCTGG TCAAGCCTGGGGGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCTGGATTCACCTT CAGTAGATATAACATGA ACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGA GTGGGTCTCATCCATTA GTACTAGTAGTAATTAC ATATACTACGCAGACTC AGTGAAGGGCCGATTCA CCTTCTCCAGAGACAAC GCCAAGAACTCACTGGA	273	GACATTTTGCTGACACAGA GCCCTGGTATCCTCTCAGT CAGTCCAGGGGAACGCGTT TCATTTAGCTGCCGTGCTC GACAGAGCATTGGGACCG CAATCCACTGGTACCAACA AAGAACTAACGGTTCACCA CGGCTTTTGATTAAGTATG CCTCCGAATCCATCAGTGG CATTCCTAGTCGTTTTTCTG GATCAGGATCAGGCACCG ACTTTACTCTCACAATTAA TAGTGTCGAAAGTGAGGA CATTGCAGACTATTATTGT	281

	TCTGCAAATGAGCGGCC TGAGAGCCGAGGACACG GCTATTTATTACTGTACG AGAGGCTGGGGGCCTTT TGACTACTGGGGCCAGG GAACCCTGGTCACCGTC TCCTCA		CAGCAATCCGGTTCCTGGC CCTATACTTTTGGTGGTGG TACTAAGTTGGAAATTAAA	
CD3B376	CAGGTGCAGCTGCAGCA GTCTGGCCCTAGACTCG TGCGGCCTTCCCAGACC CTGTCTCTGACCTGTGCC ATCTCCGGCGACTCCGT GTTCAACAACAACGCCG CCTGGTCCTGGATCCGG CAGAGCCCTTCTAGAGG CCTGGAATGGCTGGGCC GGACCTACTACCGGTCC AAGTGGCTGTACGACTA CGCCGTGTCCGTGAAGT CCCGGATCACCGTGAAC CCTGACACCTCCCGGAA CCAGTTCACCCTGCAGC TGAACTCCGTGACCCCT GAGGACACCGCCCTGTA CTACTGCGCCAGAGGCT ACTCCTCCTCCTTCGACT ATTGGGGCCAGGGCACC CTCGTGACCGTGTCCTCT	275	AGTCTGCTCTGACCCAGCC TGCCTCCGTGTCTGGCTCT CCCGGCCAGTCCATCACCA TCAGCTGTACCGGCACCTC CTCCAACATCGGCACCTAC AAGTTCGTGTCCTGGTATC AGCAGCACCCCGACAAGG CCCCCAAAGTGCTGCTGTA CGAGGTGTCCAAGCGGCCC TCTGGCGTGTCCTCCAGAT TCTCCGGCTCCAAGTCTGG CAACACCGCCTCCCTGACC ATCAGCGGACTGCAGGCTG AGGACCAGGCCGACTACC ACTGTGTGTCCTACGCTGG CTCTGGCACCCTGCTGTTT GGCGGAGGCACCAAGCTG ACCGTGCTG	283

Таблица 20. Аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных scFv антител к CD3 по Кэботу.

mAb	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
CD3B815	RYNMN	255	SISTSSNYIYYADSVKG	256	GWGPFDY	257
CD3W244	RYNMN	255	SISTSSNYIYYADSVKG	256	GWGPFDY	257
CD3W245	RYNMN	255	SISTSSNYIYYADSVKG	256	GWGPFDY	257

CD3W246	RYNMN	255	SISTSSNYIYYADSVKG	256	GWGPFDY	257
CD3W247	RYNMN	255	SISTSSNYIYYADSVKG	256	GWGPFDY	257
CD3W248	RYNMN	255	SISTSSNYIYYADSVKG	256	GWGPFDY	257
CD3B376	NNNAAWS	116	RTYYRSKWLYDYAVSVKS	117	GYSSSFDY	118

Таблица 21. Аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбранных scFv антител к CD3 по Кэботу.

mAb	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
CD3B815	RARQSIGTAIH	258	YASESIS	259	QQSNSWPYT	260
CD3W244	RARQSIGTAIH	258	YASESIS	259	QQSGSWPYT	261
CD3W245	RARQSIGTAIH	258	YASESIS	259	QQSGSWPYT	261
CD3W246	RARQSIGTAIH	258	YASESIS	259	QQSGSWPYT	261
CD3W247	RARQSIGTAIH	258	YASESIS	259	QQSGSWPYT	261
CD3W248	RARQSIGTAIH	258	YASESIS	259	QQSGSWPYT	261
CD3B376	TGTSSNIGTYKFVS	119	EVSKRPS	120	VSYAGSGTLL	121

Таблица 22. HCDR1, HCDR2, HCD3, LCD1, LCD2, LCD3, VH и VL антител к CD3

Антитело	Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
CD3B815	HCDR1	RYNMN	255
	HCDR2	SISTSSNYIYYADSVKG	256
	HCDR3	GWGPFDY	257
	LCDR1	RARQSIGTAIH	258
	LCDR2	YASESIS	259
	LCDR3	QQSNSWPYT	260
	VH (CD3H488)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSS	248
	VL (CD3L372)	DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK	249
CD3W244	HCDR1	RYNMN	255

	HCDR2	SISTSSNYIYYADSVKG	256
	HCDR3	GWGPFDY	257
	LCDR1	RARQSIGTAIH	258
	LCDR2	YASESIS	259
	LCDR3	QQSGSWPYT	261
	VH (CD3H488)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNM NWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRF TFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGP FDYWGQGTLVTVSS	248
	VL (CD3L394)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWY QQKPGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSVQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIK	250
CD3BW245	HCDR1	RYNMN	255
	HCDR2	SISTSSNYIYYADSVKG	256
	HCDR3	GWGPFDY	257
	LCDR1	RARQSIGTAIH	258
	LCDR2	YASESIS	259
	LCDR3	QQSGSWPYT	261
	VH (CD3H488)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNM NWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRF TFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGP FDYWGQGTLVTVSS	248
	VL (CD3L395)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWY QQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIK	251
CD3BW246	HCDR1	RYNMN	255
	HCDR2	SISTSSNYIYYADSVKG	256
	HCDR3	GWGPFDY	257
	LCDR1	RARQSIGTAIH	258
	LCDR2	YASESIS	259
	LCDR3	QQSGSWPYT	261
	VH (CD3H488)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNM NWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRF TFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGP	248

		FDYWGQGTLVTVSS	
	VL (CD3L396)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWY QQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSVQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIK	252
CD3BW247	HCDR1	RYNMN	255
	HCDR2	SISTSSNYIYYADSVKG	256
	HCDR3	GWGPFDY	257
	LCDR1	RARQSIGTAIH	258
	LCDR2	YASESIS	259
	LCDR3	QQSGSWPYT	261
	VH (CD3H488)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNM NWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRF TFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGP FDYWGQGTLVTVSS	248
	VL (CD3L397)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWY QQKPGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIK	253
CD3BW248	HCDR1	RYNMN	255
	HCDR2	SISTSSNYIYYADSVKG	256
	HCDR3	GWGPFDY	257
	LCDR1	RARQSIGTAIH	258
	LCDR2	YASESIS	259
	LCDR3	QQSGSWPYT	261
	VH (CD3H488)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNM NWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRF TFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGP FDYWGQGTLVTVSS	248
	VL (CD3L398)	DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQ QRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTI NSVESEDIADYYCQQSGSWPYTFGGGTKLEIK	254
CD3B376	HCDR1	NNNAAWS	116
	HCDR2	RTYYRSKWLYDYAVSVKS	117
	HCDR3	GYSSSFDY	118
	LCDR1	TGTSSNIGTYKFVS	119

	LCDR2	EVSKRPS	120
	LCDR3	VSYAGSGTLL	121
	VH (CD3H219)	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSLTCAISGDSVFNNNAA WSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSVK SRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGY SSSFDYWGQGTLVTVSS	122
	VL (CD3L150)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVS WYQQHPDKAPKVLLYEVSKRPSGVSSRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGT KLTVL	123

Консенсусная последовательность

На ФИГ. 6 показано выравнивание областей VL CD3B815, CD3W244, CD3W245, CD3W246 и CD3W247. Остатки HCDR и LCDR выделены подчеркиванием. Консенсусную аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 157** определяли для области VL и.

SEQ ID NO: 157

DIQX$_1$TQSPX$_2$X$_3$LSX$_4$SX$_5$GX$_6$RVX$_7$X$_8$X$_9$CRARQSIGTAIHWYQQKX$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$PX$_{14}$LLIX$_{15}$YASESISGX$_{16}$PSRFSGSGSGTDFTLTIX$_{17}$SX$_{18}$QX$_{19}$EDX$_{20}$AX$_{21}$YYCQQSX$_{22}$SWPYTFGX$_{23}$GTKLEIK

где X$_1$ представляет собой L или M; X$_2$ представляет собой G или S; X$_3$ представляет собой I или S; X$_4$ представляет собой V или A; X$_5$ представляет собой P или V; X$_6$ представляет собой E или D; X$_7$ представляет собой S или T; X$_8$ представляет собой F или I; X$_9$ представляет собой S или T; X$_{10}$ представляет собой T или P; X$_{11}$ представляет собой N или G; X$_{12}$ представляет собой G или K; X$_{13}$ представляет собой S или A; X$_{14}$ представляет собой R или K; X$_{15}$ представляет собой K или Y; X$_{16}$ представляет собой I или V; X$_{17}$ представляет собой N или S; X$_{18}$ представляет собой V или L; X$_{19}$ представляет собой S или P; X$_{20}$ представляет собой I или F; A$_{21}$ представляет собой D или T; X$_{22}$ представляет собой N или G; X$_{23}$ представляет собой G или D.

Связывание гуманизированных вариантов scFv антител CD3 с CD3 после теплового шока.

Вариабельные области молекул антител CD3 были организованы в виде scFv в ориентации VH-линкер-VL с использованием линкера GTEGKSSGSGSESKST (**SEQ ID NO: 108**) для экспрессии в E. coli., и затем подвергали скринингу на связывание с рекомбинантным CD3 (гомодимерный белок CD3εγ-Fc, CD3W147, **SEQ ID NO: 339**), связывание с Т-клетками и термостабильность.

CD3W147 (SEQ ID NO: 339):

QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIG SDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVGSADDAKKDAAKKDDA

KKDDAKKDGSQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDK
KKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMGSGSLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTFPPSQEEMTKNQVSLRCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTKPVLDSDGSFRLESRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSGGHHHHHH

Вкратце, последовательности, кодирующие scFv, клонировали в вектор pADL™-22c, имеющий лидерную последовательность PelB для секреции. Клетки E. coli трансформировали с помощью плазмид и выращивали в течение ночи при 37 °C в среде для выращивания микроорганизмов 2xYT с добавлением 100 мкг/мл карбенициллина. Экспрессию белка индуцировали добавлением 1 мМ IPTG, а культуры выращивали в течение ночи. После экспрессии клетки осаждали центрифугированием при 2200 X g в течение 5 мин, а супернатанты собирали и исследовали непосредственно на связывание с биотинилированным CD3W147 методом твердофазного ИФА.

Последовательности scFv-HL белков, экспрессируемых в E. coli, показаны в **Таблице 24.**

Таблица 24. Аминокислотные последовательности scFv-HL E. coli.

scFv	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
CD3W234-HL-E.c.	342	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVR QAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKN SLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVS SGTEGKSSGSGSESKSTDILLTQSPGILSVSPGERVSFSCR ARQSIGTAIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGS GSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQQSNSWPYTFGGGTKL EIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W238-HL-E.c.	343	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVR QAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKN SLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVS SGTEGKSSGSGSESKSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYASESISGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNSWPYTFGQGT KLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W242-HL-E.c.	344	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVR QAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKN SLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVS

		SGTEGKSSGSGSESKSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNSWPYTFGQGT KLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W243-HL-E.c.	345	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVR QAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKN SLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVS SGTEGKSSGSGSESKSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSNSWPYTFGQGT KLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W244-HL-E.c.	346	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVR QAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKN SLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVS SGTEGKSSGSGSESKSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYASESISGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGT KLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W245-HL-E.c.	347	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVR QAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKN SLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVS SGTEGKSSGSGSESKSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGT KLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W246-HL-E.c.	348	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVR QAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKN SLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVS SGTEGKSSGSGSESKSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGT KLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W247-HL-E.c.	349	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVR QAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKN SLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVS

		SGTEGKSSGSGSESKSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYASESISGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGT KLEIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS
CD3W248-HL-E.c.	350	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVR QAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKN SLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVS SGTEGKSSGSGSESKSTDILLTQSPGILSVSPGERVSFSCR ARQSIGTAIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGS GSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQQSGSWPYTFGGGTKL EIKGPGGQHHHHHHGAYPYDVPDYAS

Связывание вариантов scFv антител к CD3 с CD3 определяли методом твердофазного ИФА. Биотинилированный CD3W147 (**SEQ ID NO: 339**) иммобилизовали на планшете в концентрациях от 0,039 мкг/мл до 2,5 мкг/мл в 2-кратных разведениях с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 45 мин. Связанный scFv обнаруживали с использованием анти-HA-активной пероксидазы хрена в куриных эмбрионах, а затем обнаруживали с помощью хемилюминесцентного субстрата. Все исследованные молекулы scFv, полученные из CD3B815, связывали CD3ε (**ФИГ. 5**).

Затем молекулы scFv исследовали на их способность связывать Т-клетки методом проточной цитометрии. Вкратце, человеческие Т-клетки размораживали и повторно суспендировали в буферном растворе для поточного окрашивания в количестве 1 X 10^6 клеток/мл и высевали при 50 000 клеток/лунку. Для сравнения использовали положительный контроль (CD3W36), содержащий антитело к CD3 SP34, организованное как scFv-LH, и отрицательный контроль (B23) - scFv, нацеленный на F-гликопротеин из респираторно-синцитиального вируса. Супернатанты E. coli добавляли в количестве 150 мкл/лунку и инкубировали при 4 °C в течение 1 ч. После инкубации планшеты промывали буфером для окрашивания, а обнаружение проводили с помощью антитела к His, конъюгированного с Alexa-647 в буфере для окрашивания. После инкубации в смесь добавляли 200 мкл рабочего буфера IntelliCytt, и клетки повторно суспендировали в 30 мкл рабочего буфера, содержащего зеленый краситель Sytox в соотношении 1 : 1000, и анализировали на платформе iQue Screener. Гейтинг и анализ проводили как указано выше. Все молекулы scFv, полученные из CD3B815, показывали средние индексы флуоресценции, соответствующие связыванию Т-клеток (**таблица 25**).

Таблица 25. Т-клеточное связывание гуманизированных молекул scFv.

Белок	**MFI (n=2)**
CD3W245-HL-E.c.	178140.0
CD3W244-HL-E.c.	165631,0
CD3W246-HL-E.c.	153895,8

CD3W238-HL-E.c.	137380,4
CD3W242-HL-E.c.	126105,9
CD3W243-HL-E.c.	111347,6
CD3W241-HL-E.c.	120793,8
CD3W247-HL-E.c.	110932,3
CD3W248-HL-E.c.	60437,1
CD3W234-HL-E.c.	66790,3
B23	51,8
CD3W36	99451,6

Идентификация эпитопа

Эпитоп на CD3 определяли методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HX-MS). Клон антитела OKT3 использовали в качестве контроля для эксперимента HDX, поскольку его эпитоп на CD3 ε известен на основании кристаллической структуры (идентификатор PDB 1SY6) (Kjer-Nielsen, L. et al.; Proc Natl Acad Sci U S A **101**, 7675-7680).

Эксперимент по обмену данными для HDX-MS. Реакцию обмена инициировали путем смешивания 10 мкл 10 мкМ CD3W220 (**SEQ ID NO: 340**), который был образован из CD3 **εγ**, слитого с линкерной областью 26-аа, слитой с сывороточным альбумином, с 1,2 молярным избытком лиганда или без него, и 30 мкл H_2O или дейтерированного буфера (20 мМ MES, pH 6,4,150 мМ NaCl в 95% D2O или 20 мМ Tris, pH 8,4, 150 мМ NaCl в 95% D2O). Реакционную смесь инкубировали в течение 15, 50, 150, 500 или 1500 сек при 1,2 °C. Ионообменный раствор гасили путем добавления 40 мкл охлажденной 8 М мочевины, 1 М TCEP, pH 3,0, и сразу анализировали.

CD3W220 (CD3εγ-HSA-6xHis) (SEQ ID NO: 340):

QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIG
SDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVGSADDAKKDAAKKDDA
KKDDAKKDGSQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDK
KKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEEN
FKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTV
ATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL
KKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSA
KQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLE
CADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVES
KDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHEC
YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR
NLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRP
CFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKA
VMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGSHHHHHHHH

Общая процедура получения данных HDX-MS. Подготовку образцов HDx-MS проводили с помощью автоматизированной системы HDx (LEAP Technologies, г. Морристилл, штат Северная Каролина). Колонки и насосы; протеаза, протеаза типа XIII (протеаза из Aspergillus saitoi, тип XIII) /пепсин (масс./масс., 1 : 1; 2,1×30 мм) (NovaBioAssays Inc., Вобурн, штат Массачусетс); обращенно-фазная предколонка ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard (2,1 мм x 5 мм) (Waters, Милфорд, штат Массачусетс), аналитическая колонка Accucore C18 (2,1 мм x 100 мм) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс); и LC насос, VH-P10-A (Thermo Fisher Scientific). Параметры загрузочного насоса (из колонки с протеазой в обращенно-фазную колонку) были установлены следующим образом: скорость потока 600 мкл/мин, 99% воды, 1% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты. Настройки градиентного насоса (от обращенно-фазной колонки к аналитической колонке): от 8% до 28% ацетонитрила в 0,1% водной муравьиной кислоте в течение 20 мин при 100 мкл/мин.

Сбор данных МС. Анализы методом масс-спектрометрии проводили с использованием масс-спектрометра LTQ™ Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific) с температурой капилляра 275 °C, разрешением 150 000 и диапазоном масс (масса/заряд) 300-1800.

Извлечение данных HDX-MS. Приложение BioPharmma Finder 3.0 (Thermo Fisher Scientific) использовали для идентификации пептидов недейтерированных образцов перед проведением экспериментов HDX. Для экстракции значений центроидов из MS файлов необработанных данных для проведения экспериментов HDX использовали программу HDExaminer версии 2.5 (Sierra Analytics, г. Модесто, штат Калифорния).

Анализ данных HDX-MS. Извлеченные данные HDX-MS дополнительно анализировали в Excel. Все временные точки обмена (при pH 6,4 или pH 8,4 при 1,2 °C) преобразовывали в эквивалентные временные точки при pH 7,4 и 23 °C (например, 15 сек при pH 6,4 и 1,2 °C эквивалентны 0,15 сек при pH 7,4 и 23 °C; **таблица 23**).

Таблица 23. Условия реакции HDX и продолжительность обмена в зависимости от временных точек обмена с поправкой на pH 7,4 и 23 °C.

Время откорректировано для pH 7,4, 23 °C (сек)	pH 6,4 1,2 °C (сек)	pH 8,4 1,2 °C (сек)
0,015	-----	-----
0,05	-----	-----
0,15	15	-----
0,5	50	-----
1,5	150	-----
5	500	-----
15	1 500	15
50	-----	50

150	-----	150
500	-----	500
1 500	-----	1 500

Результаты. Инкубация KLCB91, биспецифические антитела, содержащие CD3W245 в качестве плеча против CD3, описанного в примере 5, с рекомбинантным CD3ε (SEQ ID NO: 340) приводила к различным паттернам общей защиты и степеней защиты в конкретных сегментах антигена. Как KLCB91, так и OKT3 защищали прерывистые сегменты (**ФИГ.** 7), указывая на конформационные неидентичные эпитопы. Защищенные сегменты сопоставлялись с кристаллической структурой CD3ε (PDB 1SY6) для визуализации связывающих эпитопов в трех измерениях.

В соответствии с кристаллической структурой OKT3, связанной с CD3ε (Uniprot ID P07766), было обнаружено, что эпитоп OKT3 состоит из пептидов, покрывающих остатки 29-37,79-84 и 87-89 CD3ε (SEQ ID NO: 340 и ФИГ. 7). CD3W245, связанный с эпитопом, частично перекрывающимся с OKT3, включал аминокислотные остатки 29-37 (PQYPGSEIL, SEQ ID NO 341), 55-63 (GSDEDHLSL, SEQ ID NO:448), и 79-84 (PRGSKP, SEQ ID NO: 449) CD3ε SEQ ID NO: 340 (ФИГ. 7).

Пример 5: Создание биспецифических антител к hK2xCD3

Области VH/VL антител к hK2, полученные в примерах 1-3, и области VH/VL антител к CD3 из примера 4 конструировали в биспецифический формат и экспрессировали как IgG1.

Конструирование scFv CD3 для получения биспецифического hK2/CD3

Области VH/VL CD3 конструировали как scFv в ориентации VH-линкер-VL или VL-линкер-VH с использованием линкера SEQ ID NO: 7 **(таблица 1)**. Аминокислотные последовательности молекул антител к CD3 в формате scFv показаны в **таблице 26.** Молекулы VH-линкер-VL или VL-линкер-VH, связывающие CD3, дополнительно сконструировали в формат scFv-шарнирная область-CH2-CH3, содержащий молчащую мутацию Fc (L234A/L235A/D265S) и мутации T350V/L351Y/F405A/Y407V, сконструированные для активации селективной гетеродимеризации. Полипептид SEQ ID NO: 109 использовали в качестве домена шарнирной области-CH2-CH3. Аминокислотные последовательности молекул антител к CD3 в формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3 (scFv-Fc) показаны в **таблице 27.** ДНК SEQ ID NO: молекулы антитела к CD3 в формате scFv и формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3 (scFv-Fc) показаны в **таблице 28**.

SEQ ID NO: 109 (huIgG1_G1m (17) -шарнирная область-Fc_C220S_AAS_ZWA)
EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Таблица 26. Последовательности ScFv выбранных антител к CD3

Название	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID

scFv			NO:
scFv29	CD3W244_HL	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWV RQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNA KNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTL VTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYAS ESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSG SWPYTFGQGTKLEIK	328
scFv30	CD3W244_LH	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQ KPGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSV QPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSS GSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADS VKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGW GPFDYWGQGTLVTVSS	329
scFv31	CD3W245_HL	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWV RQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNA KNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTL VTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYAS ESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSG SWPYTFGQGTKLEIK	330
scFv32	CD3W245_LH	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQ KPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSS GSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADS VKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGW GPFDYWGQGTLVTVSS	331
scFv33	CD3W246_HL	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWV RQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNA KNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTL VTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIKYAS ESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYCQQSG	332

		SWPYTFGQGTKLEIK	
scFv34	CD3W246_LH	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQ KPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSV QPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSS GSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADS VKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGW GPFDYWGQGTLVTVSS	333
scFv35	CD3W247_HL	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWV RQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNA KNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTL VTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKPGKAPKLLIYYAS ESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSG SWPYTFGQGTKLEIK	334
scFv36	CD3W247_LH	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQ KPGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSS GSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADS VKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGW GPFDYWGQGTLVTVSS	335
scFv37	CD3W248_HL	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWV RQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNA KNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTL VTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDILLTQSPGILSVSP GERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRTNGSPRLLIKYASES ISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQQSGSW PYTFGGGTKLEIK	336
scFv38	CD3W248_LH	DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQR TNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVES EDIADYYCQQSGSWPYTFGGGTKLEIKGGSEGKSSGSG SESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKG RFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPF	337

		DYWGQGTLVTVSS	

Таблица 27. SEQ ID NO и аминокислотные последовательности scFv-Fc (scFv-шарнирная область CH2-CH3) антител к CD3

Название scFv	Название антитела	Аминокислотные последовательности scFv-Fc (scFv-шарнирная область CH2-CH3)	SEQ ID NO:
scFv29	CD3W244-HL-Fc	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMN WVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTF SRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFD YWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS VQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	326
scFv30	CD3W244-LH-Fc	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWY QQKPGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSVQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGG SEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSIST SSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	327
scFv31	CD3W245-HL-Fc	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMN WVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTF	375

		SRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFD YWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	
scFv32	CD3W245-LH-Fc	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWY QQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGG SEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSIST SSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	376
scFv33	CD3W246-HL-Fc	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMN WVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTF SRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFD YWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS VQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK	377

		PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	
scFv34	CD3W246-LH-Fc	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWY QQKPGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSVQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGG SEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSIST SSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	453
scFv35	CD3W247-HL-Fc	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMN WVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTF SRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFD YWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	379
scFv36	CD3W247-LH-Fc	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWY QQKPGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTL	380

		TISSLQPEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGG SEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSIST SSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	
scFv37	CD3W248-HL-Fc	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMN WVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTF SRDNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFD YWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDILL TQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRT NGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSV ESEDIADYYCQQSGSWPYTFGGGTKLEIKEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	381
scFv38	CD3W248-LH-Fc	DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQ QRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTI NSVESEDIADYYCQQSGSWPYTFGGGTKLEIKGGS EGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSRYNMNWVRQAPGKGLEWVSSIST SSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLDLQMSGLRA EDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVSSEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE	382

		EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	

Таблица 28. ДНК SEQ ID NO антител к CD3 в формате scFv и scFv-шарнирная область-CH2-CH3 (scFv-Fc)

Название антитела	ДНК scFv SEQ ID NO:	ДНК scFv-Fc SEQ ID NO
CD3W244_HL	384	394
CD3W244_LH	385	395
CD3W245_HL	386	396
CD3W245_LH	387	397
CD3W246_HL	388	398
CD3W246_LH	389	399
CD3W247_HL	390	400
CD3W247_LH	391	401
CD3W248_HL	392	402
CD3W248_LH	393	403

SEQ ID NO: 384 (CD3W244_HL scFv)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGC
CTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGG
GTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAG
CAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACA
ACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCC
ATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTG
GTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAA
GCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGC
GCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCAC
CGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACT
ACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC
ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTAC
TGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGAT
CAAG

SEQ ID NO: 385 (CD3W244_LH scFv)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGAC
CGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAGAGCAT

CAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGC
AGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGGCGGATCTGA
GGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTG
CAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGCCTGCGCCTGAG
CTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGGGTGCGCCAAGC
CCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAGCAACTACATCT
ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACAACGCCAAGAAC
AGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCCATCTACTACTG
CACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGA
GCAGC

SEQ ID NO: 386 (CD3W245_HL scFv)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGC
CTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGG
GTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAG
CAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACA
ACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCC
ATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTG
GTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAA
GCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGC
GCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCAC
CGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGT
ACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC
ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTAC
TGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGAT
CAAG

SEQ ID NO: 387 (CD3W245_LH scFv)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGAC
CGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAGAGCAT
CAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGC
AGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGGCGGATCTGA
GGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTG
CAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGCCTGCGCCTGAG
CTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGGGTGCGCCAAGC
CCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAGCAACTACATCT
ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACAACGCCAAGAAC
AGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCCATCTACTACTG
CACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGA

GCAGC

SEQ ID NO: 388 (CD3W246_HL scFv)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGC
CTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGG
GTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAG
CAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACA
ACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCC
ATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTG
GTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAA
GCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGC
GCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCAC
CGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGT
ACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC
ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTAC
TGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGAT
CAAG

SEQ ID NO: 389 (CD3W246_LH scFv)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGAC
CGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAGAGCAT
CAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGC
AGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGGCGGATCTGA
GGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTG
CAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGCCTGCGCCTGAG
CTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGGGTGCGCCAAGC
CCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAGCAACTACATCT
ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACAACGCCAAGAAC
AGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCCATCTACTACTG
CACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGA
GCAGC

SEQ ID NO: 390 (CD3W247_HL scFv)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGC
CTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGG
GTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAG
CAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACA
ACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCC
ATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTG
GTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAA
GCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGC

GCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCAC
CGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACT
ACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC
ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTAC
TGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGAT
CAAG

SEQ ID NO: 391 (CD3W247_LH scFv)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGAC
CGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAGAGCAT
CAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGC
AGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGGCGGATCTGA
GGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTG
CAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGCCTGCGCCTGAG
CTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGGGTGCGCCAAGC
CCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAGCAACTACATCT
ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACAACGCCAAGAAC
AGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCCATCTACTACTG
CACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGA
GCAGC

SEQ ID NO: 392 (CD3W248_HL scFv)

GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAGTAGT
AATTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGAGACAAC
GCCAAGAACTCACTGGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTAT
TTATTACTGTACGAGAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
CACCGTCTCCTCAGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCA
AGTCCACCGGCGGAAGCGACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGGCATCCTGTCTGTGA
GTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGACAGAGCATTGGCACAGCC
ATACACTGGTATCAGCAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCT
TCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGCGGCAGTGGATCAGGGACAGAT
TTTACTCTTACCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAA
CAAAGTGGGAGCTGGCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

SEQ ID NO: 393 (CD3W248_LH scFv)

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGGCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAA
GAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGACAGAGCATTGGCACAGCCATACACTGGTATC
AGCAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCT
CTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGCGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCA

TCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTGGGAGCT
GGCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAGGCGGATCTGAGGG
AAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTGCAA
CTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCA
GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAGTAGTAATTACATATACTAC
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACT
GGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATTTATTACTGTACGA
GAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 394 (CD3W244_HL-scFv-Fc)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGC
CTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGG
GTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAG
CAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACA
ACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCC
ATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTG
GTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAA
GCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGC
GCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCAC
CGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACT
ACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC
ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTAC
TGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGAT
CAAGGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTG
AAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGA
CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
AACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 395 (CD3W244_LH-scFv-Fc)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGAC
CGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAGAGCAT

CAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGC
AGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGGCGGATCTGA
GGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTG
CAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGCCTGCGCCTGAG
CTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGGGTGCGCCAAGC
CCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAGCAACTACATCT
ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACAACGCCAAGAAC
AGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCCATCTACTACTG
CACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGA
GCAGCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCT
GAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT
CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAG
ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC
CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
GAACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 396 (CD3W245_HL-scFv-Fc)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGC
CTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGG
GTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAG
CAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACA
ACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCC
ATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTG
GTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAA
GCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGC
GCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCAC
CGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGT
ACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC
ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTAC
TGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGAT
CAAGGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTG
AAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGA

CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
AACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 397 (CD3W245_LH-scFv-Fc)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGAC
CGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAGAGCAT
CAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGC
AGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGGCGGATCTGA
GGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTG
CAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGCCTGCGCCTGAG
CTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGGGTGCGCCAAGC
CCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAGCAACTACATCT
ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACAACGCCAAGAAC
AGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCCATCTACTACTG
CACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGA
GCAGCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCT
GAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT
CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAG
ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC
CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
GAACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 398 (CD3W246_HL-scFv-Fc)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGC
CTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGG

GTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAG
CAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACA
ACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCC
ATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTG
GTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAA
GCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGC
GCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCAC
CGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGT
ACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC
ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTAC
TGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGAT
CAAGGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTG
AAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGA
CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
AACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 399 (CD3W246_LH-scFv-Fc)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGAC
CGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAGAGCAT
CAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGC
AGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGGCGGATCTGA
GGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTG
CAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGCCTGCGCCTGAG
CTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGGGTGCGCCAAGC
CCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAGCAACTACATCT
ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACAACGCCAAGAAC
AGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCCATCTACTACTG
CACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGA
GCAGCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCT
GAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT

CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAG
ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC
CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
GAACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 400 (CD3W247_HL-scFv-Fc)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGC
CTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGG
GTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAG
CAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACA
ACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCC
ATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTG
GTGACCGTGAGCAGCGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAA
GCAAGTCCACCGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGC
GCCAGCGTCGGCGACCGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCAC
CGCCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACT
ACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC
ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTAC
TGCCAGCAGAGCGGCAGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGAT
CAAGGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTG
AAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGA
CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
AACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 401 (CD3W247_LH-scFv-Fc)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGAC

CGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAGAGCAT
CAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGC
AGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGGGCGGATCTGA
GGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTG
CAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGCCTGCGCCTGAG
CTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGGGTGCGCCAAGC
CCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAGCAACTACATCT
ACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACAACGCCAAGAAC
AGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCCATCTACTACTG
CACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGA
GCAGCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCT
GAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT
CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAG
ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC
CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
GAACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 402 (CD3W248_HL-scFv-Fc)

GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAGTAGT
AATTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGAGACAAC
GCCAAGAACTCACTGGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTAT
TTATTACTGTACGAGAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
CACCGTCTCCTCAGGCGGATCTGAGGGAAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCA
AGTCCACCGGCGGAAGCGACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGGCATCCTGTCTGTGA
GTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGACAGAGCATTGGCACAGCC
ATACACTGGTATCAGCAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCT
TCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGCGGCAGTGGATCAGGGACAGAT
TTTACTCTTACCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAA
CAAAGTGGGAGCTGGCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAG
AGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCA

GCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC
TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT
CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
AGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT
CCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC
CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 403 (CD3W248_LH-scFv-Fc)

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGGCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAA
GAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGACAGAGCATTGGCACAGCCATACACTGGTATC
AGCAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCT
CTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGCGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCA
TCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTGGGAGCT
GGCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAGGCGGATCTGAGGG
AAAGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTGCAA
CTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCA
GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAGTAGTAATTACATATACTAC
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACT
GGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATTTATTACTGTACGA
GAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
AGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCA
GCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC
TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT
CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
AGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT
CCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC
CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

Конструирование Fab CD3 для получения биспецифического hK2/CD3

Специфические области VH и VL CD3 конструировали в форматах VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3 и VL-CL, соответственно, и экспрессировали в виде IgG1. Полипептид **SEQ ID NO: 158**, содержащий молчащую мутацию L234A/L235A/D265S Fc и мутацию T350V/L351Y/F405A/Y407V CH3, сконструированную с возможностью активации селективной гетеродимеризации, применяли для создания CD3-специфичной молекулы VH-CH1-шарнирая область-CH2-CH3 (**таблица 29**).

SEQ ID NO: 158 (huIgG1_G1m(17)_AAS_ZWA)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
VYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Полипептиды SEQ ID NO: 309 или 447 использовали для создания CD3-специфичной последовательности VL-CL (**Таблица 30**)

SEQ ID NO: 309 (легкая цепь каппа человека)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 447 (легкая цепь лямбда человека)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET
TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: последовательности ДНК молекул антител к CD3 в формате VH-CH1-шарниранная область-CH2-CH3 и Vl-CL показаны в **таблице 31**.

Таблица 29. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3 выбранных антител к CD3

Белок HC	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность HC
CD3W244 HC, CD3W245 HC, CD3W246 HC, CD3W247 HC, CD3W248 HC,	264	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWV RQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNA KNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDK

		SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
CD3B376 HC	359	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSLTCAISGDSVFNNNAAWS WIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSVKSRITVN PDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Таблица 30. Аминокислотные последовательности легких цепей VL-CL выбранных антител к CD3.

Белок HC	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность LC
CD3W244 LC	266	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQ PEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
CD3W245 LC	267	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
CD3W246 LC	268	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQ PEDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

CD3W247 LC	269	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQK PGKAPKLLIYYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
CD3W248 LC	270	DILLTQSPGILSVSPGERVSFSCRARQSIGTAIHWYQQRT NGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVESE DIADYYCQQSGSWPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
CD3B376 LC	272	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQ QHPDKAPKVLLYEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Таблица 31. кДНК SEQ ID NO антител к CD3 HC в формате VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3 (HC) и LC в формате VL-CL (LC).

Антитело	кДНК HC с SEQ ID NO:	кДНК LC с SEQ ID NO:
CD3W244	471	311
CD3W245	471	452
CD3W246	471	313
CD3W247	471	314
CD3W248	471	315
CD3B376	471	317

SEQ ID NO: 471 (кДНК CD3W244, CDRW245, CD3W246, CD3W247, CD3W248 HC)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAGCCAGGTGGCAGC
CTGCGCCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGTTTCACCTTCAGCCGCTACAACATGAACTGG
GTGCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCACCAGCAG
CAACTACATCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGCTTCACCTTCAGCCGCGACA
ACGCCAAGAACAGCCTGGACCTGCAGATGAGCGGTCTGCGCGCCGAGGACACCGCC
ATCTACTACTGCACCCGCGGTTGGGGCCCATTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTG
GTGACCGTGAGCAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC

TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT
CCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA
CCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACA
TGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT
GGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA
CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGA
GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC
CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGT
GGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 311 (кДНК LC CD3W244)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGAC
CGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAGAGCAT
CAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGC
AGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGC
TGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGC
CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA
GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACA
GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC
GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT
CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 452 (кДНК LC CD3W245)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGAC
CGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAGAGCAT
CAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGC
AGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGC
TGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGC
CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA
GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACA

GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC
GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT
CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 313 (кДНК LC CD3W246)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGAC
CGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAGAGCAT
CAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGC
AGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGC
TGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGC
CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA
GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACA
GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC
GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT
CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 314 (кДНК LC CD3W247)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTCGGCGAC
CGCGTGACCATCACCTGTCGTGCCCGCCAGAGCATCGGCACCGCCATCCACTGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCTACTACGCCAGCGAGAGCAT
CAGCGGTGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGGC
AGCTGGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGC
TGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGC
CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA
GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACA
GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC
GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT
CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 315 (кДНК LC CD3W248)

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGGCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAA
GAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGACAGAGCATTGGCACAGCCATACACTGGTATC
AGCAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCT
CTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGCGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCA
TCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTGGGAGCT
GGCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGTACGGTGGCTGCA
CCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTG
TTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTG
GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAA
GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA

AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA
AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

Конструирование scFv hK2-Fc для получения биспецифического hK2/CD3

Области VH/VL hK2, конструированные как scFv в ориентации VH-линкер-VL или VL-линкер-VH с использованием линкера SEQ ID NO: 7 (**таблица 1**), как описано в примере 2, дополнительно сконструировали в формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3, содержащем молчащую мутацию Fc (L234A/L235A/D265S) и мутации T350 V/T366L/K392L/T394W, конструированные для активации селективной гетеродимеризации, и экспрессировали как IgG1. Полипептид **SEQ ID NO: 110** использовали в качестве шарнирной области-CH2-CH3 константного домена.

SEQ ID NO: 110 (huIgG1_G1m (17) -шарнирная область-Fc_C220S_AAS_ZWB)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
G

Аминокислотные последовательности молекул антител к hK2 в формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3 (scFv-Fc) показаны в **таблице 32.**

Таблица 32. Аминокислотные последовательности молекул антител кhK2 в формате scFv-Fc, использовавшихся для получения биспецифического hK2/CD3

Белок	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
KL2B359-LH-scFv-Fc	351	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMH WYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDF TLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKG GSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKRLEWIGYISYS GSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
KL2B413-LH-scFv-Fc	352	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSWYQQ KPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS

		LQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIKGGSEGK SSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSER YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDQNYDILTGHYGMDVWGQGTTVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREEMTKNQVSL LCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG
KL2B467-LH-scFv-Fc	353	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQ QKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTI SRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTVL GGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGVVQPGR SLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIS YDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSSEP KSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREEMTKNQ VSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
KL2B494-LH-scFv-Fc	357	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQ KPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGG SEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGGSG GSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWGQGTMVTVSS EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK

		TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREEMTK NQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG

Конструирование Fab-Fc hK2 для получения биспецифического hK2/CD3

Специфические области VH и VL hK2 конструировали в формате VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3 и VL-CL, соответственно. Полипептид **SEQ ID NO: 378** содержащий молчащую мутацию L234A/L235A/D265S Fc и мутацию CH3 T350 V/T366L/K392L/T394W, сконструированные для активации селективной гетеродимеризации для получения KLK2-специфичной последовательности VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3).

SEQ ID NO: 378 (huIgG1_G1m(17)_AAS_ZWB)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
VLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Полипептиды SEQ ID NO: 309 или 447 использовали для получения hK2-специфичной VL-CL.

SEQ ID NO: 309 (легкая цепь каппа человека)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 447 (легкая цепь лямбда человека)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET
TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Аминокислотные последовательности плеча hK2 показаны в **таблице 33.**

Таблица 33. Аминокислотные последовательности hK2 Fab-Fc HC (VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3) для получения биспецифического hK2/CD3

Белок	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
Fab KL2B30	354	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPP GKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE

		AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYV LPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B242 Fab HC	355	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQP AGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSL KLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPS REEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLT WPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
KL2B53 Fab HC	356	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQ APGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMDSLRVEDSAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQG TMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B30 Fab w/K477	361	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPP GKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL

		GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYV LPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

Биспецифические hK2/CD3

CD3B376 и CD3W245, сконструированные в виде Fab и областей VH/VL hK2 KL2B359, KL2B413, KL2B467 и KL2B494, сконструированные в виде scFv в обеих ориентациях, как описано выше, экспрессировали для создания биспецифических антител к hK2/CD3 с плечом связывания hK2 в формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3, а также плечом связывания CD3 в формате: тяжелая цепь: VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3 и легкая цепь: VL-CL. В альтернативном варианте осуществления области VH/VL антител к CD3 CD3W245, сконструированные в виде scFv в ориентации LH-линкер-VH, и области VH/VL антител к hK2 KL2B30, KL2B242 и KL2B53, сконструированные в виде Fab, описанные выше, экспрессировали для создания биспецифических антител к hK2/CD3 с плечом связывания hK2 в формате VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3 и легкой цепи VL-CL и плечом связывания CD3 в формате scFv-шарнирная область-CH2-CH3. Линкер, используемый для создания антител к scFv, представляет собой линкер **SEQ ID NO: 7**.

Мутации T350 V_L351Y_F405A_Y407 V CH3 были сконструированы в одну тяжелую цепь, а мутации T350 V_T366L_K392L_T394W CH3 были сконструированы в другую тяжелую цепь, как описано выше. Кроме того, оба связывающих плеча HK2 и CD3 были сконструированы таким образом, чтобы содержать молчащие мутации L234A_L235A_D265S Fc-эффектора, как описано выше.

Легкая цепь KL2B242, которая принадлежит к зародышевой линии ламбда-3 человека, содержала один свободный остаток Cys, который был мутирован в Ser (C33S) для устранения неспаренных свободных Cys и предотвращения потенциальных проблем выполнимости производства.

Сконструированные цепи экспрессировали, а полученные биспецифические антитела очищали с использованием стандартных способов. Биспецифические антитела характеризовались способностью связываться с hK2 и CD3 и in vitro и in vivo цитотоксичностью, как описано в примерах 8 и 9. В **таблице 34** показаны SEQ ID NO: выбранных биспецифических антител к hKL2/CD3. В **таблице 35** показаны VH, VL и scFv SEQ ID NO: выбранных биспецифических антител к hKL2/CD3. В **таблице 36** показаны SEQ ID NO HC1, HC2, LC1 и LC2 выбранных биспецифических антител к hKL2/CD3. HC1 и LC1 относятся к тяжелой и легкой цепям плеча, связывающего hKL2. В альтернативном варианте HC1 может также относиться к scFv-шарнирная область-CH2-CH3 плеча,

связывающего hKl2. HC2 и LC2 относятся к тяжелой и легкой цепям плеча, связывающего CD3. В альтернативном варианте HC2 может также относиться к scFv-шарнирная область-CH2-CH3 плеча, связывающего CD3. В **таблице 37** показаны аминокислотные последовательности HC1, LC1, HC2 и LC2. В таблице 37 показаны последовательности HC1, LC1, HC2 и LC2.

Таблица 34. CDR SEQ ID NO по Кэботу биспецифических антител к hK2/CD3

Биспецифическое антитело	Исходное (плечо к hK2/плечо к CD3)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
KLCB91	KL2B359-LH-scFv	63	65	66	67	69	71
	CD3W245 Fab	255	256	257	258	259	261
KLCB105	KL2B359-LH-scFv	63	65	66	67	69	71
	CD3B376 Fab	116	117	118	119	120	121
KLCB95	KL2B413-LHscFv	141	142	143	144	145	146
	CD3W245 Fab	255	256	257	258	259	261
KLCB96	KL2B413-LH-scFv	141	142	143	144	145	146
	CD3B376 Fab	116	117	118	119	120	121
KLCB170	KL2B467-LH-scFv	188	189	190	191	192	193
	CD3W245 Fab	255	256	257	258	259	261
KLCB80	KL2B30 Fab	170	171	172	173	174	175
	CD3W245-LH-scFv	255	256	257	258	259	261
KLCB81	KL2B242 LC_C33S Fab	170	183	184	185	186	187
	CD3W245-LH-scFv	255	256	257	258	259	261
KLCB113	KL2B53 Fab	176	177	178	179	180	181
	CD3W245-LH-scFv	255	256	257	258	259	261

KLCB281	KL2B467-LH-scFv	188	189	190	191	192	193
	CD3B376-Fab	116	117	118	119	120	121
KLCB174	KL2B494-LH-scFv	206	207	208	182	470	209
	CD3B376-Fab	116	117	118	119	120	121
KLCB153	KL2B494-LH-scFv	206	207	208	182	470	209
	CD3W245-Fab	255	256	257	258	259	261
KLCB245	KL2B30-Fab w/ K447	170	171	172	173	174	175
	CD3W245-LH-scFv w/ K447	255	256	257	258	259	261

Таблица 35. SEQ ID NO вариабельной области плеча hK2 и плеча CD3 выбранных биспецифических антител к KL2/CD3.

Название биспецифического соединения	Плечо к hK2				Плечо к CD3			
	Название	VH1 SEQ ID NO:	VL1 SEQ ID NO:	scFv SEQ ID NO	Название	VH2 SEQ ID NO:	VL2 SEQ ID NO:	scFv SEQ ID NO:
KLCB91	KL2B359-LH-scFv(scFv20)			136	CD3W245 Fab	248	251	
KLCB105	KL2B359-LHscFv (scFv20)			136	CD3B376 Fab	122	123	
KLCB95	KL2B413-LH-scFv (scFv18)			134	CD3W245 Fab	248	251	
KLCB96	KL2B413-LH-scFv(scFv18)			134	CD3B376 Fab	122	123	
KLCB170	KL2B467-LH-scFv(scFv28)			325	CD3W245 Fab	248	251	
KLCB80	KL2B30 Fab	162	163		CD3W245-LH-scFv (scFv32)			331

KLCB81	KL2B242LC_C33S Fab	166	444		CD3W245-LH-scFv (scFv32)			331
KLCB113	KL2B53 Fab	164	165		CD3W245-LH-scFv (scFv32)			331
KLCB281	KL2B467-LH-scFv (scFv28)			325	CD3B376 Fab	122	123	
KLCB174	KL2B494-LH-scFv			316	CD3B376-Fab	122	123	
KLCB153	KL2B494-LH-scFv			316	CD3W245-Fab	248	251	
KLCB245	KL2B30-Fab w/ K447	162	163		CD3W245-LH-scFv w/ K447			331

Таблица 36. SEQ ID NO аминокислот HC и LC биспецифических антител к hK2/CD3

Название биспецифического соединения	Плечо к hK2			Плечо к CD3		
	Название	HC1 или scFv-Fc SEQ ID NO:	LC1 SEQ ID NO:	Название	HC2 или scFv-Fc SEQ ID NO:	LC2 SEQ ID NO:
KLCB91	KL2B359 LH-Fc	351		CD3W245 Fab	358	267
KLCB105	KL2B359-LH-Fc	351		CD3B376 Fab	359	272
KLCB95	KL2B413-LH-Fc	352		CD3W245 Fab	358	267
KLCB96	KL2B413-LH-Fc	352		CD3B376 Fab	359	272
KLCB170	KL2B467-LH-Fc	353		CD3W245 Fab	358	267
KLCB80	KL2B30 Fab	354	221	CD3W245- LH-scFv-Fc	360	
KLCB81	KL2B242LC_C33S Fab	355	445	CD3W245- LH-scFv-Fc	360	
KLCB113	KL2B53 Fab	356	222	CD3W245- LH-scFv-Fc	360	
KLCB281	KL2B467-LH-scFv (scFv28)	353		CD3B376 Fab	359	272
KLCB174	KL2B494-LH-scFv	357		CD3B376-Fab	359	272

KLCB153	KL2B494-LH-scFv	357		CD3W245-Fab	358	267
KLCB245	KL2B30-Fab w/ K447	361	221	CD3W245-LH-scFv w/ K447	362	

Таблица 37. Аминокислотные последовательности биспецифических HC1 и HC2

Белок	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
KL2B359-LH-scFv-Fc	351	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWY QQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISS VEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKGGSEGKSSG SGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSI TSDYAWNWIRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRV TISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFW GQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSREEMTK NQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG
KL2B413-LH-scFv-Fc	352	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSWYQQKP GKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPE DFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIKGGSEGKSSGSGSE SKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY WMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYYVDSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILTG HYGMDVWGQGTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLP PSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY LTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B467-LH-scFv-Fc	353	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKP GQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEA

		GDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTVLGGSEGKSS GSGSESKSTGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGF TFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYS GSYWAFDYWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY VLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
Fab KL2B30	354	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQP PGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B242 Fab HC	355	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQ PAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLS LKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

KL2B242LC_C33S_Fab LC	445	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYASWYQQKP GQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAL DEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA GVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
KL2B53 Fab HC	356	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQ APGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMDSLRVEDSAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWG QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVS VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B494-LH-scfV-Fc	357	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKP GQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEA GDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGSEGKSSG SGSESKSTGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSHYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVM VTALLYDGMDVWGQGTMVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KL2B30 Fab w/K477	361	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQP PGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD

		YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYVLPPSREEMTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
CD3W245 Fab HC	358	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYNMNWVR QAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSRDNAKN SLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYV YPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
CD3B376 Fab	359	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSLTCAISGDSVFNNNAAWSWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDT SRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYVYPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
CD3W245-LH-scfv-Fc	360	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKP GKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSES

		KSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYN MNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSR DNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQG TLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
CD3W245-LH-scfv-Fc w/K447	362	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRARQSIGTAIHWYQQKP GKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSGSWPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSES KSTGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSRYN MNWVRQAPGKGLEWVSSISTSSNYIYYADSVKGRFTFSR DNAKNSLDLQMSGLRAEDTAIYYCTRGWGPFDYWGQG TLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

Таблица 38. HC и LC ДНК SEQ ID NO биспецифических антител к hK2/CD3

Название биспецифического соединения	Плечо к hK2			Плечо к CD3		
	Название	HC1 или scFv-Fc ДНК SEQ ID NO:	LC1 ДНК SEQ ID NO:	Название	HC2 или scFv-Fc ДНК SEQ ID NO:	LC2 ДНК SEQ ID NO:
KLCB91	KL2B359 LH - scFv-Fc	363		CD3W245 Fab	371	312
KLCB105	KL2B359-LH-scFv-Fc	363		CD3B376 Fab	372	317

KLCB95	KL2B413-LH-scFv-Fc	364		CD3W245 Fab	371	312
KLCB96	KL2B413-LH-scFv-Fc	364		CD3B376 Fab	372	317
KLCB170	KL2B467-LH-scFv-Fc	365		CD3W245 Fab	371	312
KLCB80	KL2B30 Fab	367	303	CD3W245-LH-scFv-Fc	373	
KLCB81	KL2B242LC_C33S Fab	369	446	CD3W245-LH-scFv-Fc	373	
KLCB113	KL2B53 Fab	368	304	CD3W245-LH-scFv-Fc	373	
KLCB281	KL2B467-LH-scFv-Fc	365		CD3B376 Fab	372	317
KLCB174	KL2B494-LH-scFv	366		CD3B376-Fab	372	317
KLCB153	KL2B494-LH-scFv	366		CD3W245-Fab	371	312
KLCB245	KL2B30-Fab w/ K447	370	303	CD3W245-LH-scFv-Fc w/ K447	374	

SEQ ID NO: 363 (KL2B359-LH-scFv-Fc)

GAGATTGTTCTCACCCAATCCCCAGCTACTCTCTCTCTTTCACCCGGTGAGCG
GGCAACCCTCTCCTGTAGAGCCAGCGAGAGCGTGGAGTATTTTGGCACATCCCTGAT
GCACTGGTATCAGCAAAAACCAGGACAACCCCCCAGACTCCTCATATATGCCGCCTC
AAATGTCGAGAGTGGGATACCTGCACGGTTTTCAGGAAGCGGCAGCGGTACTGACT
TCACATTGACTATATCCTCTGTAGAGCCAGAGGATTTTGCAGTCTACTTCTGCCAGC
AAACTAGGAAGGTTCCATATACTTTTGGGGGCGGTACAAAAGTTGAGATAAAGGGC
GGCTCCGAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCACCGGCGGCA
GCCAAGTACAGCTCCAGGAGTCAGGACCTGGGCTCGTCAAACCATCTCAGACATTG
TCCCTGACATGCACAGTTTCCGGCAACAGTATTACTTCCGACTATGCTTGGAATTGG
ATCAGGCAATTCCCAGGAAAGCGGCTCGAGTGGATAGGTTATATTTCTTACTCTGGA
TCTACTACCTACAATCCCAGTTTGAAGTCTCGCGTGACAATTAGCCGGGACACATCA
AAAAATCAATTCTCACTTAAACTTAGTTCTGTAACCGCTGCCGATACAGCCGTGTAC
TACTGCGCCACTGGTTATTATTATGGAAGCGGATTTTGGGGGCAAGGAACTTTGGTG
ACCGTCTCTTCCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCA
GCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA
CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCA
CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC

CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGCTGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC
GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 364 (KL2B413 - LH - scFv - Fc)

GAGGTACAACTTGTCGAAAGTGGCGGTGGAGTCGTCCAGCCTGGGCGATCAC
TTCGCCTCTCCTGTGTAGCCTCTGGTTTCACTTTCTCATCTTACGACATACACTGGGT
CCGCCAGGCACCTGGTAAGGGGCTGGAGTGGGTTGCCATCATTAGTTACGATGGCTC
CAAAAAAGATTACACCGATAGCGTAAAGGGCAGATTTACCATTTCCAGGGATAATT
CAAAGAACACCCTGTATCTGCAAATGGACAGCCTCCGCGTCGAAGACTCTGCAGTTT
ATAGCTGTGCCAGGGAGTCAGGCTGGTCCCATTATTACTATTATGGTATGGACGTTT
GGGGCCAGGGAACCATGGTCACTGTTAGTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
TCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC
TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG
ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTT
GTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCG
TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT
CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGC
TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC
AGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC
GGGT

SEQ ID NO: 365 (KL2B467-LH-scFv-Fc)

CAGAGCGTACTTACCCAGCCTCCCAGCGTGTCTGTAGCCCCAGGACAGACAG
CCAGTATTACATGCGGTGGTGACAATATAGGTTCCAAATCCGTGCATTGGTACCAGC
AGAAGCCAGGGCAAGCTCCCGTGCTCGTGGTATATGATAATTCCGACCGCCCTTCCG
GCATTCCCGAACGGTTTAGTGGTTCAAATTCAGGCACCACAGCAACTCTGACCATAA
GCAGAGTCGAAGCTGGAGACGAAGCCGACTACTACTGTCAGGTATGGGACTCTAGT

AGTGACCACCCTGTCGTCTTCGGTGGGGGAACCAAAGTGACCGTTCTGGGCGGCTCC
GAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCACCGGCGGCAGCCAGG
TCCAGCTCGTAGAAAGTGGGGGCGGCGTAGTTCAGCCAGGCAGGAGTCTCCGGCTG
AGTTGTGCAGCCAGCGGCTTTACTTTTTCCTACTATGGAATGCACTGGGTACGTCAG
GCACCCGGCAAAGGTTTGGAGTGGGTCGCATTCATTTCTTATGATGGATCAAATAAG
TATTATGCCGATAGTGTAAAGGGCAGATTTACAATAAGTCGAGACAACTCAAAGAA
CACTCTCTACCTCCAAATGAATAGTCTTCGGGCAGAGGATACTGCAGTGTACTATTG
TGCTCATCTTCCTTATTCCGGTTCTTACTGGGCATTCGATTATTGGGGGCAAGGGACA
CAAGTTACCGTGTCTAGCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACC
GTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC
CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGT
GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC
AAGAACCAGGTCAGCCTGCTGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGT
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAG
ATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA
CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 366 (KL2B494-LH-scFv-Fc)

AGCAGCGAATTGACCCAACCACCTTCCGTCAGCGTCGCACCAGGGCAAACCG
CCCGCATCACATGCGGTGGGAACAATATAGGAAGCAAATCTGTCCACTGGTACCAG
CAAAAACCAGGACAAGCCCCTGTTCTGGTCGTCTATGATGACAGCGACAGACCAAG
TGGTATTCCCGAGAGATTCTCCGGTAGCAACTCTGGAAATACAGCTACTTTGACCAT
CTCCAGAGTTGAGGCTGGTGACGAGGCAGATTACTATTGCCAGGTCTGGGACAGCT
CCAGCGACCACGTCGTATTCGGTGGCGGGACCAAGCTGACTGTGCTGGGCGGCTCC
GAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCACCGGCGGCAGCCAGG
TGCAGTTGGTAGAGTCAGGAGGGGGCCTCGTTCAACCTGGTGGCAGCCTCCGTTTGT
CTTGTGCTGCCAGTGGATTTACTTTCAGTCACTACGCAATGAGCTGGGTGAGACAAG
CACCTGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTCTCCACTATCGGCGGTTCAGGGGGGAGCACT
TACTACGCTGACTCTGTAAAAGGTCGCTTTACTATATCTAGAGATAACTCTAAAAAC
ACACTCTACTTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATACAGCCGTGTACTACTG
CGCCAAGCCTCATATTGTAATGGTCACTGCCCTCTTGTATGATGGCATGGATGTTTG
GGGCCAAGGGACAATGGTGACAGTCTCAAGCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACTC
ACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT
TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG
TGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA

CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATC
TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCCCCATCCCG
GGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACCTC
ACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 367 (кДНК KLK2B30 Fab HC)

CAGGTTCAACTTCAAGAATCCGGGCCAGGTCTGGTCAAGCCTTCAGAGACTT
TGTCCCTTACTTGCACAGTGAGCGGTGGCTCTATCTCAAGTTACTACTGGTCATGGA
TACGGCAGCCCCCAGGAAAGGGGCTTGAGTGGATTGGGTACATTTATTACTCAGGG
TCAACAAACTACAATCCCTCCCTCAAATCCCGAGTGACAATTAGTGTCGATACATCT
AAAAACCAGTTTTCCCTGAAATTGAGCTCAGTCACCGCAGCTGATACTGCAGTCTAT
TATTGTGCTGGCACAACAATCTTCGGGGTAGTAACTCCAAACTTCTACTACGGGATG
GACGTGTGGGGGCAAGGAACAACCGTAACAGTAAGTAGTGCCTCCACCAAGGGCCC
ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT
GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAG
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA
TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
AAATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGG
GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG
GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA
AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG
CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG
TACGTGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGTG
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT
TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT
CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 303 (кДНК KLK2B30 Fab LC)

GATATTCAAATGACCCAGTCACCATCATTCCTGTCCGCCTCAGTGGGAGATCG
CGTCACTATTACTTGTCGTGCTAGCCAGGGGATATCATCATATTTGGCTTGGTATCA
ACAAAAGCCAGGAAAGGCCCCAAAATTCCTTATATATGCAGCTAGTACACTCCAGA
GTGGTGTTCCTAGCCGGTTCTCTGGCAGCGGCTCAGGGACCGAGTTCACCCTGACAA
TCTCCAGCTTGCAGCCCGAAGACTTTGCAACCTACTATTGCCAGCAACTGAACTCCT

ATCCTCTGACTTTCGGGGGAGGAACCAAGGTTGAGATTAAACGGACAGTGGCCGCT
CCTTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTCT
GTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGT
GGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCA
AGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACACTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAG
AAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGAC
CAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGT

SEQ ID NO: 368 (кДНК KL2B53 Fab HC)

GAGGTACAACTTGTCGAAAGTGGCGGTGGAGTCGTCCAGCCTGGGCGATCAC
TTCGCCTCTCCTGTGTAGCCTCTGGTTTCACTTTCTCATCTTACGACATACACTGGGT
CCGCCAGGCACCTGGTAAGGGGCTGGAGTGGGTTGCCATCATTAGTTACGATGGCTC
CAAAAAAGATTACACCGATAGCGTAAAGGGCAGATTTACCATTTCCAGGGATAATT
CAAAGAACACCCTGTATCTGCAAATGGACAGCCTCCGCGTCGAAGACTCTGCAGTTT
ATAGCTGTGCCAGGGAGTCAGGCTGGTCCCATTATTACTATTATGGTATGGACGTTT
GGGGCCAGGGAACCATGGTCACTGTTAGTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
TCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC
TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG
ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTT
GTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCG
TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT
CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGC
TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC
AGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC
GGGT

SEQ ID NO: 304 (кДНК KL2B53 Fab LC)

GATATTGTAATGACTCAGTCACCCTCTTCACTGAGTGCATCAGTAGGTGATCG
CGTTACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAAGACATTTCAAATTACCTTGCATGGTACCA
ACAAAAGCCCGGAAAAGTGCCAAAGTTTTTGATTTATGCCGCTTCAACACTCCATTC
AGGAGTGCCCTCTCGTTTCAGTGGATCTGGCAGTGGCACCGATTTTACTCTCACAAT
AAGCAGTCTCCAGCCTGAGGATGTAGCCACCTATTATTGCCAAAAATATAATTCAGC
CCCCTATACTTTTGGACAGGGCACACGCCTTGAGATTAAACGGACAGTGGCCGCTCC

TTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGTC
GTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA
CAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGG
ACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACACTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAG
CACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAA
GTCTTTCAACCGGGGCGAGTGT

SEQ ID NO: 369 (кДНК KLK2B242 Fab HC и KL2B242LC_C33S Fab HC)

CAAGTACAACTTCAAGAGTCTGGCCCTGGGCTTGTTAAGCCCTCAGAGACCT
TGTCACTGACCTGTACCGTATCAGGCGGGTCAATTTCATCTTACTACTGGAGTTGGC
TTCGTCAGCCTGCCGGATCTGGACTGGAGTGGATAGGTAGACTGTATGTTTCCGGCT
TTACAAATTACAACCCATCTTTGAAAAGCCGTGTGACTCTCAGCCTCGACCCTTCTC
GGAATCAACTTTCACTTAAATTGTCTTCTGTTACAGCTGCCGACACTGCAGTATATTA
TTGTGCAGGGGACTCAGGCAACTATTGGGGATGGTTTGATCCTTGGGGGCAGGGGA
CCCTGGTAACCGTGAGTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC
CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC
TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT
GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA
AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT
CACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC
GTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA
CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC
ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCCCCATCCC
GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACCT
CACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCAC
CGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 446 (кДНК LC KLK2B242LC_C33S)

AGTTATGAGCTGACTCAACCACCCAGTGTCAGCGTATCCCCAGGAGAAACTG
CCTCTATAACATGCAGCGGAGACCAGTTGGGAGAAAATTACGCCTCCTGGTACCAA
CAGAAGCCTGGACAAAGTCCTGTCCTCGTTATTTATCAAGATTCTAAACGTCCCTCT
GGGATCCCCGAACGATTCTCCGGCTCTAACTCTGGGAATACCGCTACCTTGACAATA
AGTGGTACACAGGCACTTGATGAAGCTGATTATTACTGCCAGGCATGGGATAACAG
CATTGTGGTTTTCGGGGGCGGCACCAAACTCACAGTTCTCGGTCAGCCCAAGGCTGC
ACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCAC
ACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGC

CGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCA
ACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCC
CACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAG
TGGCCCCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO: 370 (кДНК HC KLK2B30, wK477)

CAGGTTCAGCTGCAAGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTCAAGCCTTCCGAGACAC
TGTCTCTGACCTGCACCGTGTCTGGCGGCTCCATCTCCTCCTACTACTGGTCCTGGAT
CAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTACTACTCCGGCTC
CACCAACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCTCCGTGGACACCTCCA
AGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTGTACT
ATTGTGCTGGCACCACCATCTTCGGCGTGGTCACCCCTAACTTCTACTACGGCATGG
ACGTGTGGGGCCAAGGCACAACAGTGACAGTCTCTTCTGCCTCCACCAAGGGTCCAT
CGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG
GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGC
GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC
TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA
ATCTTGTGACAAAACTCACACTTGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGG
GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA
CCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA
GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG
ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
CGTGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGTGCC
TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
CCGGAGAACAACTACCTCACCTGGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCTCTCTCCCT
GTCTCCGGGAAAA

SEQ ID NO: 373 (кДНК CB3W245 - LH-scFv-Fc

GACATACAAATGACACAATCACCCTCTTCTCTTTCTGCAAGCGTTGGCGACCG
TGTCACTATCACTTGTCGAGCCCGCCAGTCCATAGGTACTGCCATTCACTGGTATCA
ACAGAAGCCTGGCAAGGCTCCCAAACTCCTGATTAAGTATGCCAGCGAGAGCATTT
CCGGCGTACCTTCAAGATTTTCCGGCTCCGGTAGTGGGACAGATTTCACTCTCACTA
TATCTAGCCTCCAACCAGAAGATTTCGCCACTTACTACTGTCAACAATCAGGTTCAT
GGCCTTACACTTTCGGCCAGGGGACAAAATTGGAGATCAAGGGCGGCTCCGAGGGC
AAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCACCGGCGGCAGCGAGGTGCAAC
TGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT
GCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCA

GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAGTAGTAATTACATATACTAC
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACT
GGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATTTATTACTGTACGA
GAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
AGCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCA
GCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC
TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT
CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
AGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT
CCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC
CTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 374 (CD3W245-LH-scFv-Fc c/K447)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAG
AGTGACCATTACCTGCCGGGCCAGACAGTCTATCGGCACCGCTATCCACTGGTATCA
GCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCTAAGCTGCTGATTAAGTACGCCTCCGAGTCCATCTC
CGGCGTGCCCTCCAGATTTTCTGGCTCTGGATCTGGCACCGACTTTACCCTGACAAT
CTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTCCGGCTCTTG
GCCTTACACCTTTGGTCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGGGCGGATCTGAGGGAA
AGTCCAGCGGCTCCGGCAGCGAAAGCAAGTCCACCGGCGGAAGCGAGGTGCAGCTG
GTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTAAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCT
GCTTCTGGCTTCACCTTCAGCCGGTACAACATGAACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGC
AAAGGCCTGGAATGGGTGTCCTCCATCTCCACCTCCAGCAACTACATCTACTACGCC
GACTCCGTGAAGGGCAGATTCACCTTCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGGA
CCTGCAGATGTCTGGCCTGAGAGCTGAGGACACCGCTATCTACTACTGCACCAGAG
GCTGGGGACCCTTCGATTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCATCTGAGC
CCAAATCTAGCGACAAAACTCACACTTGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCA
GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC
CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC
GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC
CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAAGCCCTCCC
AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG
TGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG

GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGGAACGTC
TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCTCTC
TCCCTGTCTCCGGGAAAA

SEQ ID NO: 371 (CD3W245 Fab-HC-Fc)

GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGATATAACATGAACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAGTAGT
AATTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCTTCTCCAGAGACAAC
GCCAAGAACTCACTGGATCTGCAAATGAGCGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTAT
TTATTACTGTACGAGAGGCTGGGGGCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
CACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC
AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
CGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT
TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATG
TCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCC
AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG
TGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG
GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC
GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATCCCGGGAGG
AGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 312 (CD3W245 Fab-LC-Fc)

GACATACAAATGACACAATCACCCTCTTCTCTTTCTGCAAGCGTTGGCGACCG
TGTCACTATCACTTGTCGAGCCCGCCAGTCCATAGGTACTGCCATTCACTGGTATCA
ACAGAAGCCTGGCAAGGCTCCCAAACTCCTGATTAAGTATGCCAGCGAGAGCATTT
CCGGCGTACCTTCAAGATTTTCCGGCTCCGGTAGTGGGACAGATTTCACTCTCACTA
TATCTAGCCTCCAACCAGAAGATTTCGCCACTTACTACTGTCAACAATCAGGTTCAT
GGCCTTACACTTTCGGCCAGGGGACAAAATTGGAGATCAAGCGGACAGTGGCCGCT
CCTTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTCT
GTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGT
GGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCA
AGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACACTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAG

AAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGAC
CAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGT

SEQ ID NO: 372 (CD3B376 Fab-HC-Fc)

CAGGTGCAGCTCCAACAGAGTGGTCCCAGACTCGTGAGACCCTCTCAAACAC
TCAGTTTGACTTGTGCCATCTCAGGCGATTCAGTTTTCAACAACAATGCAGCTTGGA
GCTGGATTAGGCAGTCACCTAGTCGCGGTCTTGAATGGCTTGGGCGTACATACTATC
GCTCTAAATGGTTGTATGATTACGCTGTGTCCGTGAAGAGCCGAATCACCGTAAACC
CTGATACCTCCAGGAATCAGTTCACATTGCAACTGAATAGTGTGACTCCCGAGGATA
CTGCACTCTATTATTGTGCCCGAGGATATAGCAGTAGCTTCGACTATTGGGGACAAG
GGACACTCGTTACCGTTAGTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG
CACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGG
CGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA
CTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCAGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCCCCCATC
CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT
ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC
AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCGCCCTCGTGAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

SEQ ID NO: 317 (CD3B376 Fab-LC-Fc)

CAGTCTGCTCTGACCCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGCTCTCCCGGCCAGTCCAT
CACCATCAGCTGTACCGGCACCTCCTCCAACATCGGCACCTACAAGTTCGTGTCCTG
GTATCAGCAGCACCCCGACAAGGCCCCCAAAGTGCTGCTGTACGAGGTGTCCAAGC
GGCCCTCTGGCGTGTCCTCCAGATTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCAACACCGCCTCCC
TGACCATCAGCGGACTGCAGGCTGAGGACCAGGCCGACTACCACTGTGTGTCCTAC
GCTGGCTCTGGCACCCTGCTGTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGTCAG
CCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCC
AACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGT
GGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCT
CCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAG
CAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGT
GGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

Пример 6: Определение биофизических характеристик биспецифических антител к hK2xCD3

Аффинность выбранных биспецифических антител hK2 x CD3

Аффинность выбранных биспецифических антител hK2xCD3 к hK2 или CD3 человека измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). SPR представляет собой способ изучения силы взаимодействия между двумя партнерами по связыванию без использования меток путем измерения изменения массы при формировании и диссоциации комплекса. Антитела захватывали на чипе датчика, покрытом антителом к Fc, с последующей инъекцией растворимого hK2 или растворимого рекомбинантного CD3 человека в различных концентрациях, и определяли время ассоциации и диссоциации. После диссоциации поверхность восстанавливали подходящим раствором для подготовки к следующему взаимодействию. Кинетическую информацию (константы скорости ассоциации и диссоциации) экстрагировали путем подбора сенсограмм к модели связывания Ленгмюра в соотношении 1 : 1. Аффинность связывания (KD) регистрировалась как отношение констант скорости (k диссоциации/k ассоциации). Значения KD выбранных биспецифических антител к hK2/CD3 перечислены в **Таблице 39.**

Таблица 39. Значения K_D выбранных биспецифических антител к hK2/CD3 для соответствующих связывающих плеч

Плечо к KLK2	K_D (нМ)
KL2B467 Fab	0,09
KL2B494 Fab	0,06
KL2B359-LH-scFv	0,63
KL2B413-LH-scFv	16,4
CD3B376 Fab	20-40
CD3W245 Fab	0,14
CD3W245 LH scFv	20-30
KL2B30 Fab	2
KL2B53 Fab	0,1
KL2B242 Fab	0,14

Термостабильность выбранных биспецифических антител к hK2/CD3

Термостабильность образцов биспецифических антител определяли методом NanoDSF с использованием автоматического прибора Prometeus. Измерения проводили путем загрузки образца в 24-капиллярную матрицу из 384-луночного планшета для

образцов. Измерение каждого образца выполняли дважды. Пользовательский интерфейс Promeeus NanoDSF (вкладка Melting Scan) использовали для настройки экспериментальных параметров анализа. Термическое сканирование образов охватывает диапазон от 20°C до 95°C со скоростью 1,0°C/мин. Технология Dual-UV контролирует флуоресценцию интактного триптофана и тирозина при длинах волн излучения 330 нм и 350 нм, и это соотношение (F350 нм/F330 нм) наносится на график зависимости от температуры для создания кривой разворачивания белка. Для измерения Tm всех молекул при концентрации 0,5 мг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7,4, используют NanoDSF. Измеренные значения Tm перечислены в **таблице 40**.

Таблица 40. Значения Tm для плеч связывания KLK2 или CD3 выбранных биспецифических антител к hK2 x CD3.

Молекула	**Tm (°C) с помощью DSF**
KL2B413 (scFv)	67
KL2B359 (scFv)	67
KL2B30 (Fab)	> 70
KL2B242 (Fab)	> 70
KL2B53 (Fab)	> 70
KL2B467 (Fab)	> 70
KL2B494 (Fab)	> 70
CD3B376 (Fab)	61
CD3W245 LH scFv	66

Потенциал самостоятельного связывания методом AC-SINS (спектроскопия наночастиц с аффинным захватом-самостоятельным взаимодействием [Affinity Capture-Self Interaction Nanoparticle Spectroscopy])

Для измерения склонности Ат-кандидата к самостоятельному взаимодействию использовали скрининг с высокой пропускной способностью. Процент самостоятельных взаимодействий обычно приводит к плохой растворимости Ат и проблемам с производством Ат на последующих стадиях. В этом анализе наночастицы золота (AuNP) покрывают козьим антителом к человеческому IgG (H+L) и затем инкубируют с потенциальными Ат присутствии поликлональных козьих IgG. Любое Ат-кандидат, вступающее в самостоятельное связывание, привлекает AuNP в непосредственную близость, вызывая сдвиг длины волны наночастиц (λ_p), также называемую длиной волны при максимальной поглощении (λ_{max}). Величина смещения ($\Delta\lambda max$) для каждого потенциального Ат указывает на прочность его самостоятельного связывания. В настоящем анализе используются подходящие контрольные антитела, которые не демонстрируют высокий потенциал самостоятельного связывания. Все молекулы, исследованные в настоящем анализе, не показали низкий потенциал самостоятельного

связывания.

Пример 7: Определение характеристик биспецифических антител к hK2xCD3 in vitro и in vivo

Цитотоксичность биспецифических антител hK2xCD3 in vitro

Потенциал цитотоксичности сгенерированных биспецифических антител измеряли in vitro с помощью анализа Т-клеточно-опосредованной цитотоксичности с использованием визуализации с перерывами в реальном времени на платформе Incucyte. Биспецифические антитела исследовали в hK2-положительной клеточной линии VCaP в присутствии выделенных пан-человеческих CD3+ Т-клеток от здоровых доноров при соотношении эффектор : мишень (E : T) 3 : 1. Гибель клеток путем апоптоза контролировали путем измерения флуоресцентного сигнала от красителя, который стабильно экспрессируется целевыми клетками VCaP.

Т-клетки от здоровых доноров совместно инкубировали с клетками VCaP KLK2+. Биспецифические антитела к KLK2xCD3 дозировали от 0 нМ до 100 нМ в течение 96 часов. Использовали соотношение эффектор/мишень (ET), равное 3 : 1. На **ФИГ. 8А** показана целевая цитотоксичность in vitro биспецифических молекул к KL2BxCD3, измеренная с помощью системы визуализации incuCyte в режиме реального времени для количественной оценки гибели клеток-мишеней. Целевые клетки стабильно экспрессировали красный ядерный краситель, что измерялось с помощью системы визуализации IncuCyte в реальном времени для количественной оценки гибели клеток-мишеней. Общий лизис клеток опухоли был нанесен на график на основании AUC кинетической кривой уничтожения в реальном времени клеток VCaP (**ФИГ. 8А**). На **ФИГ. 8В** показана целевая цитотоксичность in vitro биспецифических молекул к KL2BxCD3, измеренная с помощью флуоресцентного реагента каспазы 3/7 для измерения сигнала апоптоза при гибели клеток-мишеней. Зеленый флуоресцентный реагент каспазу 3/7 использовали для измерения сигнала апоптоза при гибели клеток-мишеней. Общая активность реагента каспазы 3/7 была нанесена на график на основании AUC кривой активности каспазы 3/7 в реальном времени (**ФИГ. 8В**). Данные показывают, что биспецифические антитела к hK2/CD3 способствуют дозозависимому уменьшению жизнеспособных клеток VCaP со временем и, следовательно, индуцируют опосредованную Т-клетками смерть опухолевых клеток VCaP. Таким образом, биспецифические антитела к hK2xCD3 эффективны при опосредовании активации Т-клеток и демонстрируют дозозависимое уничтожение опухолевых клеток KLK2+.

Активация и пролиферация Т-клеток посредством биспецифических молекул к hK2xCD3 in vitro

Биспецифические антитела к hK2xCD3 исследовали на их способность стимулировать активацию и пролиферацию Т-клеток. Т-клетки от здоровых доноров маркировали с помощью CFSE (5 мкМ) и совместно культивировали с клетками VCap KLK2 (+). Биспецифические антитела к KLK2xCD3 дозировали от 0 нМ до 100 нМ в течение 96 часов. Использовали соотношение эффектор/мишень (ET), равное 3 : 1. Через

96 часов совместной инкубации клетки собирали и окрашивали с использованием клеточного красителя CD25. Анализ методом проточной цитометрии проводили на проточном цитометре Fortessa с программным обеспечением Flowjo. Определяли частоты разведения красителя CTV и маркера активации CD25. Частоту получения CD25-положительных клеток в различных дозах использовали для составления графика in vitro активации Т-клеток (**ФИГ. 9А**). Гейт пролиферации определяли с использованием группы обработки 0 нМ. Частоту получения клеток, входящих в гейт пролиферации, использовали для составления графика in vitro активации Т-клеток (**ФИГ.9В**). Данные подтверждают дозозависимую активацию и пролиферацию Т-клеток различными биспецифичными антителами к KLK2xCD3.

Высвобождение цитокинов Т-клеток с помощью биспецифических молекул к hK2xCD3 in vitro.

Влияние антител к hK2xCD3 на высвобождение цитокинов Т-клеток измеряли in vitro. Образцы супернатанта собирали из эксперимента по цитотоксичности in vitro, описанного выше. Анализ 13-plex cytokine Luminex проводили для количественного определения концентрации IFN- и TNF-α при разных дозах биспецифических антител к hK2xCD3. На **ФИГ. 10А** и **ФИГ. 10В** показано функциональное высвобождение цитокинов Т-клетками, активированными с помощью биспецифических антител к KLK2xCD3 дозозависимым образом.

Эффективность биспецифических антител к hK2xCD3 в модели с прижившимся подкожным(п/к) ксенотрансплантатом предстательной железы человека у гуманизированных Т-клетками мышей.

Целью настоящего исследования является оценка in vivo эффективности биспецифического антитела к KLK2xCD3 в модели ксенотрансплантата опухоли предстательной железы человека с п/к введением VCaP мышам. Эффективность in vivo биспецифических антител к KLK2xCD3 оценивали в мышиной модели с п/к ксенотрансплантатом опухоли предстательной железы человека VCaP. Противоопухолевую эффективность молекул к KLK2xCD3 оценивали в прижившихся ксенотрансплантатах VCaP предстательной железы. В качестве подходящего хозяина для прививания опухолей человека и человеческих Т-клеток использовали интактных самцов мышей NSG. Клеточная линия предстательной железы человека VCaP была получена из Американской коллекции клеточных культур (ATCC). Клетки VCaP собирали во время экспоненциального роста и вводили мышам в концентрации 1×10^7 клеток п/к объеме 0,2 мл в правый бок. 20e6 Т-клеток человека вводили интраперитонеально каждому животному. Оценивали 3 уровня доз с 5-кратным возрастанием: 0,2 мг/кг, 1 мг/кг и 5 мг/кг (**ФИГ. 39А**). Биспецифические антитела вводили дважды в неделю и/п. Образец крови из глаза отбирали через 6 часов после и/п введения первой дозы, а уровни функциональных цитокинов измеряли путем анализа с помощью Luminex (**ФИГ. 39В**). Показатели объема опухоли и массы тела собирали два раза в неделю во всех исследованиях. Дельту процентного ингибирования роста опухоли (ΔTGI) определяли как разность между

средней опухолевой нагрузкой опытных и контрольных групп, рассчитанной как %ΔTGI=([(TVc-TVc0) (TVt- TVt0)/(TVc) TVc0) ×100; где «TVc» представляет собой среднюю опухолевую нагрузку в данной контрольной группе, «TVc0» представляет собой среднюю начальную опухолевую нагрузку в данной контрольной группе, «TVt» представляет собой среднюю опухолевую нагрузку в получавшей лечение группе, а «TVt0» представляет собой среднюю исходную опухолевую нагрузку в получавшей лечение группе. %TGI был определен как ([TVc-TVt]/TVc) ×100.

По меньшей мере одно соединение KLK2xCD3 по изобретению демонстрировало дозозависимый противоопухолевой эффект, т. е., при дозе 1 мг/кг KLCB80 демонстрировал незначительное ингибирование роста опухоли, а при 5 мг/кг - устойчивый противоопухолевый эффект. Оценка цитокинов через 6 часов после введения первой дозы показала, что высвобождение цитокинов активными KLCB80 было выше фонового, что согласуется с эффективностью in vivo.

Пример 8: Получение и определение характеристик CAR, содержащего 11B6.

Конструирование и экспрессия CAR hK2 11B6 scFv

Конструкты CAR hK2 (CAR13: HL_HCHumanized_LCHumanized_20AA и CAR15: LH_LCHumanized_HCHumanized_20AA), содержащие scFv, полученные из антитела 11B6, нацеленного на hK2, конструировали, как показано на **ФИГ. 11**. Т-клетки CD3/CD28, стимулированные с помощью Dynabeads Human T-Expander, подвергали электропорации, затем три раза промывали средой OPTI-MEM (Invitrogen) и повторно суспендировали в OPTI-MEM в конечной концентрации 50×10^6/мл. Затем 0,1 мл клеток (5E6) смешивали с 10 мкг РНК, кодирующей IVT CAR, и проводили электропорацию. После электропорации Т-клетки переносили в 6-луночный планшет и немедленно возвращали в инкубатор при 37 °C. Первичные человеческие Т-клетки подвергали электропорации без мРНК (контроль) или в присутствии 10 мкг мРНК для экспрессии или scFv CAR к hK2, или нерелевантного контрольного CAR. Через сутки после электропорации экспрессию CAR на поверхности клеток измеряли с помощью проточной цитометрии после окрашивания с помощью 2 мкг/мл биотинилированного L-белка и конъюгированного со стрептавидином PE **ФИГ. 12**, верхняя панель) или 1 мкг/мл биотинилированного hK2 (1 мкг/мл) и конъюгированного со стрептавидином PE (нижняя панель) (**ФИГ. 12,** нижняя панель).

Через сутки после электропорации проводили подсчет Т-клеток. 1E5T-клетки собирали для каждого исследования. Клетки дважды промывали буфером FACS в количестве 200 мкл/лунка на микротитрационном планшете, причем супернатант отбрасывали. Все лунки окрашивали с помощью 100 µл буфера для окрашивания, содержащего белок L (Genscript, кат. № M000971:500; 2 мкг/мл), инкубировали в течение по меньшей мере 30 минут при 4 °C в защищенном от света месте. Клетки промывали дважды путем добавления буферного раствора FACS, используя 150 мкл/лунку для микротитрационного планшета с помощью буфера FACS. Центрифугирование при 400 x g проводили в течение 4 минут при комнатной температуре. Далее супернатанты выбрасывали. Все лунки окрашивали с помощью 100 µл Streptaviin-R-Physcoytrin (SA-PE;

1:25 0) и красителем для дифференциации живых/мертвых фиксированных клеток в ближнем ИК-диапазоне (1:10 00), инкубировали в течение по меньшей мере 30 минут при 4°C при защите от света. После этого клетки были готовы для анализа методом проточной цитометрии.

Как показано на **ФИГ. 12**, **верхняя панель,** на обоих KLK2 HL и LH CAR (41,4% и 66,3% соответственно) наблюдали окрашивание белка L, тогда как в контрольных Т-клетках, которые представляли собой Т-клетки без электропорации с мРНК, наблюдали только фоновое окрашивание (~5,5%). Как показано на **ФИГ. 12**, **нижняя панель,** экспрессию CAR на первичных Т-клетках человека также можно обнаружить посредством J&J внутреннего меченого биотином рекомбинантного белка KLK2 (белок биотин-Hk2, партия: 20180810, CBIS ID:KL2W12.CB.003,2,4 мг/мл, 1 мМ бензамидина) с последующим SA-PE. Как показано, Т-клетки эффективно экспрессировали CAR KLK2 LH (82,7%), как было измерено методом проточной цитометрии, тогда как в контрольных Т-клетках, которые были Т-клетками без электропорации с мРНК или неописанными контрольными CAR (не KLK2), наблюдали только фоновое окрашивание (~1,73% или 1,19%). Результаты показаны для репрезентативных донорских Т-клеток и воспроизводились с разными донорами (по меньшей мере n=3).

В **таблице 41** показаны номера SEQ ID CAR13 и 15.

Уничтожение опухолевых клеток с помощью CAR-Т-клеток hK2 11B6

Для изучения цитотоксичности CAR-Т-клеток 11B6 проводили совместное культивирование с целью анализа цитотоксичности в отношении меченных флуоресцентным красителем Cell Trace Violet (CTV) клеток методом проточной цитометрии.

Т-клетки подготавливали следующим образом. Через двадцать четыре часа после ЭП Т-клетки подсчитывали и повторно суспендировали в концентрации, необходимой для наиболее концентрированного/желаемого соотношения E : T. Т-клетки добавляли в концентрации 100 мкл/лунку для анализа (2x 10^6 клеток/мл; высевали 100 мкл с соотношением E : T 10 : 1, т. е., 2E5 Т-клеток на 2E4 клеток-мишеней). Готовили маточный раствор с концентрацией E : T 10 : 1 и двукратные последовательные разведения в полной среде для Т-клеток (Optimizer w/CTS, 5% сыворотка человека, 1% GlutaMax) до 0,3125 : 1. Т-клетки высевали (100 мкл/лунка) в трех повторностях в обработанный 96-луночный круглодонный планшет для культур тканей.

Меченые CTV клетки-мишени получали следующим образом. 20 мкл DMSO добавляли во флакон с раствором для окрашивания CTV. Этот исходный раствор разводили 20 мл PBS (нагретым до 37 °C) для получения 5 мкМ окрашивающего раствора. Собирали 10E6 опухолевых клеток, дважды промывали PBS и повторно суспендировали в количестве 4E6/мл (2,5 мл). Добавляли равный объем (2,5 мл) раствора для окрашивания CTV. Клетки инкубировали в течение 20 минут в инкубаторе при 37 °C. В клетки добавляли 40 мл PRMI+20% FBS для абсорбции любого несвязанного красителя. Далее клетки инкубировали в течение 5 минут. Клетки центрифугировали в течение 5 минут при

400 x g. Клеточный осадок повторно суспендировали в предварительно нагретом RPMI+10% FBS. Тем временем Т-клетки высевали при желаемом соотношении E/T, описанном выше. Линии опухолевых клеток VCap (KLK2+) и DU145 (KLK 2-) повторно подсчитывали, а затем клетки повторно суспендировали в количестве 2E5/мл и в объеме 100 мкл в двух повторностях. Клетки совместно инкубировали с меченными линиями опухолевых клеток в 96-луночном планшете с плоским дном.

Анализ цитотоксичности проводили методом проточной цитометрии следующим образом. Через 20 часов совместного культивирования все клетки переносили в 96-луночный планшет с U-образным дном и промывали. Через 20 часов совместного культивирования все клетки собирали из 96-луночного планшета с плоским дном и переносили в 96-луночный планшет с U-образным дном, а затем промывали. 30 мкл 0,25% трипсина добавляли во все лунки и инкубировали в течение 5 минут в инкубаторе при 37 °C. Через 5 минут все опухолевые клетки собирали в 96-луночный планшет с U-образным дном. Клетки дважды центрифугировали и промывали в течение 5 минут при 400 x g. Затем клеточный осадок повторно суспендировали в разбавленном (1 : 1000) красителе для дифференциации живых и мертвых клеток LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR (100 мкл). Клетки инкубировали в течение 30 мин при 4 °C и промывали буфером FACS дважды путем центрифугирования клеток в течение 5 минут при 400 x g. После промывки все клетки фиксировали в течение 10 минут с использованием 100 мкл фиксирующего буфера BD Cytofix™ (50 мкл буфера FACS+50 мкл фиксирующего буфера). Клетки центрифугировали и промывали в течение 5 минут при 400 x g. Клеточный осадок повторно суспендировали в буфере FACS. Окрашенные образцы анализировали с помощью многоцветной проточной цитометрии после завершения периода инкубации.

Процент цитотоксической активности рассчитывали с использованием следующего уравнения:

% удельной смерти=% окрашивания Near IR+CTV + (мертвые) клетки - % спонтанного окрашивания Near IR+CTV+ / (100% - % спонтанного окрашивания Near IR+CTV+ (мертвые) клетки) x 100%

Через сутки после временной трансфекции клетки-мишени (hK2-положительные VCaP и hK2-отрицательные клетки DU145) метили флуоресцентным красителем Cell Trace Violet (CTV) и затем совместно культивировали с CAR-T-клетками hK2. Контрольные Т-клетки служили отрицательным контролем эффектора. Клетки совместно культивировали в течение 20 часов при соотношении эффектор/мишень (E/T) в диапазоне от 0,3125 до 10:1, как показано на **ФИГ. 13**. Процент уничтожения измеряли как отношение абсолютного числа живых (отрицательных по окрашиванию для оценки жизнеспособности клеток) (CTV-положительных) клеток-мишеней, оставшихся в совместной культуре, к числу живых клеток-мишеней, культивированных без CAR-T-клеток. Как было показано, Т-клетки CAR LH hK2 специфически и эффективно лизируют клеточные линии VCaP hK2 (+) рака предстательной железы человека (**ФИГ. 13**, верхняя панель), но не K2 (-) клетки DU145 (**ФИГ. 13**, нижняя панель) при соотношении E/T от 10

: 1 до 0,3125 : 1, тогда как в Т-клетках, которые представляли собой контроль CAR или hK2 HL, наблюдалась только фоновая цитотоксичность.

CAR-T-клетки hK2 также тестировали на цитотоксичность в реальном времени с использованием системы xCELLigence в качестве системы анализа клеток в реальном времени для оценки активности, опосредованной иммунным клетками цитолиза клеток-мишеней.

В каждую лунку 96-луночных планшетов E-plate (ACEA Biosciences) добавляли 50 мкл среды для культивирования клеток-мишеней (ACEA Biosciences), а фоновое значение импеданса измеряли и выражали как клеточный индекс. Затем прикрепленные клетки-мишени VCap и DU145 диссоциировали и высевали с плотностью 5E4 (VCap), 5E3 (DU145) клеток/лунку Е-планшета в объеме 100 мкл и оставляли пассивно адгезироваться к поверхности электрода. После посева Е-планшет выдерживали при температуре окружающей среды в ламинарном шкафу в течение 30 минут, а затем переносили в устройство RTCA MP внутри инкубатора для культивирования клеток. Запись данных начинали немедленно и вели ее на протяжении всего эксперимента (96 часов) с 15-минутными интервалами.

Во время обработки (в течение 24 ч после посева раковых клеток) сбор данных приостанавливали, 50 мкл среды удаляли из каждой лунки, а эффекторные CAR-T-клетки добавляли в различных соотношениях эффектор/мишень (E:T) в объеме 50 мкл. CAR-T-клетки и неописанные контрольные CAR (не hK2-специфические) Т-клетки снова суспендировали. Затем готовили двукратные разведения в 96-луночном планшете в двух повторностях (соотношение E/T от 5 : 1 до 0,156 : 1). К клеткам-мишеням также добавляли контроли мишени плюс эффектора (Т-клетки, не подвергавшиеся электропорации с РНК).

Клетки-мишени VCaP (5E4) и DU145 (5E3) инкубировали с контролем, hK2 11B6 CAR LH после электропорации с 10 мкг мРНК (через 24 часа после трансфекции) или с контрольными CAR-T-клетками при различных соотношениях E/T в течение приблизительно 72 часов. Для VCap и DU145 показаны графики нормализованного клеточного индекса (CI) на **ФИГ. 14** и **ФИГ. 15**, соответственно. При засеивании отдельно клетки-мишени, прикрепленные к планшету и пролиферированные, увеличивали показание CI. Когда Т-клетки добавляли к клеткам-мишеням, hK2 CAR и контрольные CAR-T-клетки опосредовали hK2-положительный цитолиз VCaP клеток и последующее постепенное снижение CI при соотношении E/T от 5 : 1 до 0,156 : 1.

Продукция цитокинов hK2 11B6 CAR-T-клетками

ИФН-γ, продуцируемый цитотоксическими Т-клетками, обеспечивает возможность применения иммунного надзора над опухолями, что позволяет непосредственно ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз некоторых злокачественных новообразований in vivo и in vitro. Для определения способности hK2 CAR-T-клеток распознавать и активировать опухолевые клетки hK2 (+) собирали супернатантиз анализа уничтожения клеток с использованием системы xCELLigence, как описано в примере 3.

После около 70 часов совместного культивирования супернатант собирали и анализировали с помощью твердофазного ИФА в соответствии с указаниями к набору для ИФА (IFN-γ ELISA MAX™ Deluxe, BioLegend, кат. № 430106).

Продукция IFN-γ, стимулированная антигенами CAR-T-клеток, показана на **ФИГ. 16**. hK2 CAR LH и контрольные CAR-T-клетки секретировали IFN-γ во время совместного культивирования, с hK2-экспрессирующими клетками VCap в зависимости от соотношения E : T, чего не происходило во время совместного культивирования с hK2-отрицательными клетками DU145. Неописанный контрольный CAR секретировал гораздо большее количество IFN-γ из-за гораздо более высокого уровня экспрессии антигена, чем у hK2. Регистрировали среднюю концентрацию IFN-γ ± SD (пг/мл) из культур при повторных измерениях.

Пример 9: Создание и определение характеристик дополнительных конструктов scFv CAR

Как описано в примере 1, эктодомен, клонированный в качестве scFv 11B6, не сохранял связывание при повышенной температуре (55 °C), и, следовательно, были инициированы дополнительные кампании для создания новых гуманизированных антител от родительского 11B6.

CAR hK2, содержащие термически стабилизированные scFv, полученные из антитела 11B6 (CAR1-CAR12, CAR14, CAR16). Описание и SEQ ID NO: конструктов CAR, содержащих термически стабилизированные scFv, представлены в **таблице 13**. Названия в описании (HCG5, LCD6, HC3, LCB7) относится к VH или VL цепям, идентифицированным в примере 1, а 20AA относится к длинному линкеру из 20 аминокислот между парами VH/VL в scFv. ScFv в CAR клонировали в ориентации VH-L-VL или VL-L-VH.

Полученные scFv также включают в конструкты CAR (CAR17-CAR36) и дополнительно характеризуют. В **таблице 41** показаны сгенерированные конструкты CAR и их SEQ ID NO. Используемая последовательность сигналов представляет собой MAWVWTLLFLMAAAQSIQA (SEQ ID NO: 24)

Таблица 41.

Название конструкта CAR	Описание scFv в CAR	SEQ ID NO: аминокислотная последовательность scFv CAR	SEQ ID NO: полный домен ECD CAR (включая сигнальную последовательность)	SEQ ID NO: аминокислотная последовательность CAR
CAR1	HL_HCG5_LCD6_20AA (scFv1)	8	29	46
CAR2	HL_HCG5_LCHumanized_20AA (scFv2)	9	30	47

CAR3	HL_HCF3_LCB7_20AA (scFv3)	10	31	48
CAR4	HL_HCG5_LCB7_20AA (scFv4)	11	32	49
CAR5	LH_LCD6_HCG5_20AA (scFv5)	12	33	50
CAR6	LH_LCHumanized_HCF3_20AA (scFv6)	13	34	51
CAR7	LH_LCHumanized_HCG5_20AA (scFv7)	14	35	52
CAR8	LH_LCB7_HCF3_20AA (scFv8)	15	36	53
CAR9	LH_LCB7_HCG5_20AA (scFv9)	16	37	54
CAR10	LH_LCD6_HCF3_20AA (scFv10)	17	38	55
CAR11	HL_HCHumanized_LCB7_20AA (scFv11)	18	39	56
CAR12	HL_HCHumanized_LCD6_20AA (scFv12)	19	40	57
CAR13	HL_HCHumanized_LCHumanized_20AA (scFv13)	20	41	58
CAR14	LH_LCD6_HCHumanized_20AA (scFv14)	21	42	59
CAR15	LH_LCHumanized_HCHumanized_20AA (scFv15)	22	43	60
CAR16	LH_LCB7_HCHumanized_20AA (scFv16)	23	44	61
CAR17	KL2B413_HL (scFv17)	133	149	153
CAR18	KL2B413_LH (scFv18)	134	150	154
CAR19	KL2B359_HL (scFv19)	135	151	155
CAR20	KL2B359_LH (scFv20)	136	152	156
CAR21	KL2B357_HL	318	410	426
CAR22	KL2B357_LH	319	411	427

CAR23	KL2B358_HL	320	412	428
CAR24	KL2B358_LH	321	413	429
CAR25	KL2B360_HL	322	414	430
CAR26	KL2B360_LH	323	415	431
CAR27	KL2B30_HL	404	416	432
CAR28	KL2B30_LH	405	417	433
CAR29	KL2B53_HL	406	418	434
CAR30	KL2B53_LH	407	419	435
CAR31	KL2B242_HL	408	420	436
CAR32	KL2B242_LH	409	421	437
CAR33	KL2B467_HL	324	422	438
CAR34	KL2B467_LH	325	423	439
CAR35	KL2B494_HL	308	424	440
CAR36	KL2B494_LH	316	425	441
LCHumanized относится к hu11B6_VL HCHumanized относится к hu11B6_VH				

Аминокислотные последовательности scFv CAR показаны в таблице 13 примера 2.

Ниже перечислены CAR полноразмерного домена ECD и полноразмерных аминокислотных последовательностей.

SEQ ID NO: 29-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 1 (HL_HCG5_LCD6_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA
WNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAV
YYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSL
GERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 30-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 2 (HL_HCG5_LCHumanized_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA
WNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAV
YYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSL
GERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 31-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 3 (HL_HCF3_LCB7_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA
WNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVY

YCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLG
ERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 32-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 4 (HL_HCG5_LCB7_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA
WNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAV
YYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSL
GERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 33-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 5 (LH_LCD6_HCG5_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS
LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQ
TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA
VSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKL
SSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 34-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 6 (LH_LCHumanized_HCF3_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS
LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ
TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA
VSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLS
SVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 35-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 7 (LH_LCHumanized_HCG5_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS
LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ
TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA
VSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKL
SSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 36-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 8 (LH_LCB7_HCF3_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS
LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQ
TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA
VSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLS
SVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 37-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 9 (LH_LCB7_HCG5_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS
LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQ
TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA
VSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKL
SSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 38-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 10 (LH_LCD6_HCF3_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS
LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQ
TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA
VSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLS
SVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 39-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 11 (HL_HCHumanized_LCB7_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA
WNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAV
YYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSL
GERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 40-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 12 (HL_HCHumanized_LCD6_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA
WNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAV
YYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSL
GERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 41-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 13 (HL_HCHumanized_LCHumanized_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA
WNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAV
YYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSL
GERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 42-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 14 (LH_LCD6_HCHumanized_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS
LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQ
TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA
VSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKL
SSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 43-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 15 (LH_LCHumanized_HCHumanized_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS
LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ
TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA
VSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKL
SSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 44-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 16 (LH_LCB7_HCгуманиза_20AA)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS
LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQ
TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA
VSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKL
SSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 149 (KL2B413_HL)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM
TWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARDQNYDILTGHYGMDVWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLT
QSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSG
SGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 150 (KL2B413_LH)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAEIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSWY
QQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPRT
FGQGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
SYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR
AEDTAVYYCARDQNYDILTGHYGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 151 (KL2B359_HL)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYA
WNWIRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY
YCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGE
RATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTL
TISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 152 (KL2B359_LH)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSL
MHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTR
KVPYTFGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS
GNSITSDYAWNWIRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSV
TAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 410 (KL2B357_HL)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYA

WNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY
YCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLG
ERATINCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 411 (KL2B357_LH)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSL
MHWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQT
RKVPYTFGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTV
SGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSS
VTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 412 (KL2B358_HL)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYA
WNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY
YCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGE
RATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTL
TISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 413 (KL2B358_LH)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSL
MHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTR
KVPYTFGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS
GNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSV
TAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 414 (KL2B360_HL)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYA
WNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY
YCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGE
RATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTL
TISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 415 (KL2B360_LH)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSL
MHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTR
KVPYTFGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS
GNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSV
TAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 416 (KL2B30_HL)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWS
WIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC
AGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPS
FLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGT
EFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 417 (KL2B30_LH)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAW
YQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPL
TFGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS
SYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT
AVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 418 (KL2B53_HL)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIH
WVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMDSLRVEDSAV
YSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQS
PSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 419 (KL2B53_LH)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAW
YQQKPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAP
YTFGQGTRLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFT
FSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMDSLR
VEDSAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMVTVSS

SEQ ID NO: 420 (KL2B242_HL)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWS
WLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYY
CAGDSGNYWGWFDPWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSSYELTQPPSVSVSP
GETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS
GTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 421 (KL2B242_LH)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQASYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWY
QQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIV
VFGGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSI
SSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAA
DTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 422 (KL2B467_HL)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYG
MHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSSggsegkssgsgseskstggsQSVLTQPPSVSVA
PGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLT
ISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTV

SEQ ID NO: 423 (KL2B467_LH)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHW
YQQKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSS
SDHPVVFGGGTKVTVggsegkssgsgseskstggsMAWVWTLLFLMAAAQSIQAQVQLVESGG

GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKG
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 424 (KL2B494_HL)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSVRQAPGGGLEWVSTGGSG
STYYADSVKGGLEWVSTNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTSGGSGSGS
GSGSESKGSGSSELTQPPSVSPARGQTARITCGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVVYDDRS
DRPSGIMYYYYQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL VL

SEQ ID NO: 425 (KL2B494_LH)

MAWVWTLLFLMAAAQSIQASSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWY
QQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSS
DHVVFGGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
GFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM
NSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWGQGTMVTVSS

SEQ ID NO: 46 - CAR 1 (HL_HCG5_LCD6_20AA; pDR000083431)

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISY
SGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLV
TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM
HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTR
KVPYTFGQGTKLEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO: 47 - CAR 2 (HL_HCG5_LCHumanized_20AA; pDR000083432)

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISY
SGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLV
TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM
HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTR
KVPYTFGQGTKLEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO: 48 - CAR 3 (HL_HCF3_LCB7_20AA; pDR000083436)

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYS
GSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVT
VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMH
WYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRK
VPYTFGQGTKLEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG

GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR

SEQ ID NO: 49 - CAR 4 (HL_HCG5_LCB7_20AA; pDR000083437)

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISY
SGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLV
TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM
HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTR
KVPYTFGQGTKLEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO: 50 - CAR 5 (LH_LCD6_HCG5_20AA; pDR000083438)

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE
GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGK
GLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYG
SGFWGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO: 51 - CAR 6 (LH_LCHumanized_HCF3_20AA; pDR000083440)

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE
GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGK
GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGS
GFWGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR

SEQ ID NO: 52 - CAR 7 (LH_LCHumanized_HCG5_20AA; pDR000083441)

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE
GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGK
GLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYG
SGFWGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE

GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO: 53 - CAR 8 (LH_LCB7_HCF3_20AA; pDR000083443)

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE
GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGK
GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGS
GFWGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR

SEQ ID NO: 54 - CAR 9 (LH_LCB7_HCG5_20AA; pDR000083444)

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE
GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGK
GLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYG
SGFWGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO: 55 - CAR 10 (LH_LCD6_HCF3_20AA; pDR000083446)

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE
GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGK
GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGS
GFWGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR

SEQ ID NO: 56 - CAR 11 (HL_HCHumanized_LCB7_20AA; pDR000083433)

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYS
GSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLV
TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM
HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTR
KVPYTFGQGTKLEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE

GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO: 57 - CAR 12 (HL_HCHumanized_LCD6_20AA; pDR000083434)

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYS
GSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLV
TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM
HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTR
KVPYTFGQGTKLEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO: 58 - CAR 13 (HL_HCHumanized_LCHumanized_20AA; pDR000083435)

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYS
GSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLV
TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM
HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTR
KVPYTFGQGTKLEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO: 59 - CAR 14 (LH_LCD6_HCHumanized_20AA; pDR000083439)

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE
GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGK
GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYG
SGFWGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO: 60 - CAR 15 (LH_LCHumanized_HCHumanized_20AA; pDR000083442)

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE
GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGK
GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYG
SGFWGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE

GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO: 61 - CAR 16 (LH_LCB7_HCHumanized_20AA; pDR000083445)

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE
GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGK
GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYG
SGFWGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

> SEQ ID NO: 153 - CAR17 (KL2B413_HL; PBD000091628)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQ
DGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILTGHYG
MDVWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRAS
QGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYY
CQQLNSYPRTFGQGTKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD
FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQALPPR

> SEQ ID NO: 154 - CAR18 (KL2B413_LH; PBD000091623)

EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQS
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIKGGSEGKSSGS
GSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWV
ANIKQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILT
GHYGMDVWGQGTTVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD
FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQALPPR

> SEQ ID NO: 155 - CAR19 (KL2B359_HL; PBD000091576)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKRLEWIGYISYS
GSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVT
VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMH
WYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVP
YTFGGGTKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW
APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC

ELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

> SEQ ID NO: 156 - CAR20 (KL2B359_LH; PBD000091577)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAAS
NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKGGSEGK
SSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKRL
EWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGF
WGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW
APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC
ELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 426 (CAR21)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYS
GSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVT
VSSggsegkssgsgseskstggsDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSLMHWYQQK
PGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFG
GGTKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA
GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV
KFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 427 (CAR22)

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA
SNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKggsegk
ssgsgseskstggsQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIG
YISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQ
GTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA
GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV
KFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 428 (CAR23)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYS
GSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVT
VSSggsegkssgsgseskstggsEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKP
GQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGG
TKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF
SRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 429 (CAR24)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYS

GSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVT
VSSggsegkssgsgseskstggsEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKP
GQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGG
TKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF
SRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 430 (CAR25)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYS
GSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVT
VSSggsegkssgsgseskstggsEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKP
GQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGG
TKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF
SRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 431 (CAR26)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYS
GSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVT
VSSggsegkssgsgseskstggsEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKP
GQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGG
TKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF
SRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 432 (CAR27)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGS
TNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVW
GQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISS
YLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQL
NSYPLTFGGGTKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO: 433 (CAR28)

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQS
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIKGGSEGKSSGS
GSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYI
YYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYG

MDVWGQGTTVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO: 434 (CAR29)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAIISYD
GSKKDYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMDSLRVEDSAVYSCARESGWSHYYYYGMD
VWGQGTMVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ
DISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYY
CQKYNSAPYTFGQGTRLEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD
FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQALPPR

SEQ ID NO: 435 (CAR30)

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASTLH
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGTRLEIKGGSEGKSSG
SGSESKSTGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWV
AIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMDSLRVEDSAVYSCARESGWSHYYY
YGMDVWGQGTMVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPR

SEQ ID NO: 436 (CAR31)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSG
FTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQG
TLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSSYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYAC
WYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDN
SIVVFGGGTKLTVLTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR

SEQ ID NO: 437 (CAR32)

SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPS
GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVLGGSEGKSS
GSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWI
GRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWF

DPWGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR

SEQ ID NO: 438 (CAR33)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISY
DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDY
WGQGTQVTVSSggsegkssgsgseskstggsQSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHW
YQQKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSS
SDHPVVFGGGTKVTVTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO: 439 (CAR34)

QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDNSDRP
SGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTVggsegkss
gsgseskstggsQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVA
FISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWA
FDYWGQGTQVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

SEQ ID NO: 440 (CAR35)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGG
SGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDG
MDVWGQGTMVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSSSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGN
NIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD
YYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED
GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD
TYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 441 (CAR36)

SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRP
SGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGSEG
KSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPGK
GLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIV

MVTALLYDGMDVWGQGTMVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED
GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD
TYDALHMQALPPR

Для идентификации различных CAR на основании scFv проводили оценку их антиген-зависимой активации посредством клеток Jurkat-Lucia™ NFAT (JNL). Ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) представляет собой семейство факторов транскрипции, впервые идентифицированных как регулятор иммунных клеток. Активация Т-клеток приводит к притоку кальция, тем самым активируя кальциневрин, который дефосфорилирует богатый серином клеточный сигнал внутриядерной локализации на N-конце NFAT, что приводит к ядерному импорту NFAT. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, впоследствии можно обнаружить тоническую передачу сигнала в связи с кластеризацией scFv с помощью люциферазы Firefly, управляемой промотором NFAT в репортерной клеточной линии JNL.

Лентивирусная трансдукция проводилась следующим образом. Клетки JNL собирали и повторно суспендировали до1E6/мл. Добавляли 500 мкл клеток JNL и лентивируса в MOI 3 и перемешивали с помощью пипетки в направлении вверх и вниз. Смесь инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 24 часов. В каждую лунку добавляли 500 мкл среды JNL, при этом культивирование продолжали в инкубаторе при 37°C. Клетки переносили в сосуд T25 на 4й день. На 5й-6й день проводили валидацию трансдукции. Собирали 150 мкл клеток для изучения экспрессии CAR посредством соответствующего реагента обнаружения для конкретного применяемого CAR (например, белка биотина-hK2 для обнаружения CAR). Клетки JNL сохраняли при 5×10^{5}/мл до тех пор, пока не было получено достаточного количества клеток для замораживания или использования в анализе.

Оценку термически стабилизированных scFv CAR проводили в анализе по гену-репортеру на предмет антигензависимой активности. Клетки Jurkat, содержащие ген люциферазы, регулируемый с помощью отвечающего на сигнал NFAT-промотора, трансдуцировали с использованием различных конструктов CAR hK2. Исследование выполняли следующим образом. Проводили совместное культивирование с линиями клеток-мишеней, причем соотношение эффектора и клеток-мишеней составляло 2 : 1. Клетки JNL центрифугировали для удаления любой секретируемой люциферазы в среде; затем клетки JNL повторно суспендировали в свежей среде в концентрации 4×10^{5}/мл. Клетки собирали. Затем получали как антиген-положительные, так и антигенотрицательные линии клеток-мишеней при 2E5/мл. К 100 мкл клеток JNL добавляли 100 мкл клеток-мишеней. Для контроля присутствия только клеток JNL вместо клеток-мишеней добавляли 100 мкл среды. Для положительного контроля клетки JNL или клетки JNL CAR добавляли в 1 x коктейль для стимуляции клеток и инкубировали в инкубаторе при 37 °C в течение 24 часов. 150 мкл супернатанта собирали в 96-луночный

планшет и центрифугировали для удаления клеток. 100 мкл супернатанта переносили из планшета на черный планшет с твердым дном. Затем добавляли 100 мкл реагента обнаружения QUANTI-luc. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут перед считыванием результатов с помощью планшетного ридера Envision.

Экспрессию CAR (CAR 1-10) на клетках JNL определяли посредством биотинилированного hK2 с последующим конъюгированным с стрептавидином PE; результаты показаны на **ФИГ. 17**. Экспрессия CAR в трансдуцированных клетках JNL была подтверждена для всех выбранных клонов с 60-75% клеток, демонстрирующих обнаруживаемую экспрессию в различных клонах и исходных CAR 11B6. Клетки JNL, содержащие указанные клоны CAR и нетрансдуцированные клетки JNL (UTD), совместно культивировали с линиями клеток-мишеней (VCaP или DU145 клетки), а активность люциферазы измеряли как интенсивность люминесценции. Клоны считали активными, когда интенсивность люминесценции в присутствии антиген-экспрессирующих клеток превышала уровень UTD-клеток в 1,5 раза.

Связывание между конструктом CAR и его распознанным клеточным антигеном (hK2 на клетках-мишенях) приводит к экспрессии люциферазы в клетках JNL (**ФИГ. 18**). Клетки JNL, содержащие указанные клоны CAR и клетки JNL (нетрансдуцированные, далее UTD) совместно культивировали с линиями клеток-мишеней (VCaP или DU145 клетки), а активность люциферазы измеряли как интенсивность люминесценции. Клоны считали активными, когда интенсивность люминесценции в присутствии антиген-экспрессирующих клеток превышала уровень UTD-клеток в 1,5 раза. Для всех 10 клонов и исходных HL и LH 11B6 антиген-зависимой активации обнаружено не было.

Пример 10: Экспрессия дополнительных scFv CAR на Т-клетках

Для оценки функции термически стабилизированных CAR-Т-клеток получали термически стабилизированный 11B6 и исходные scFv-трансдуцированные CAR-Т-клетки с использованием лентивирусной трансдукции. Первичные Т-клетки человека трансдуцировали с термически стабилизированным 11B6 и родительским лентивирусом scFv CAR с множественностью инфекции (MOI), равной 3. Экспрессию CAR определяли с помощью биотинилированного hK2 (1 мкг/мл), а затем конъюгированного со стрептавидином PE через 14 дней после трансдукции.

Использовали следующий экспериментальный протокол:

Была проведена лентивирусная упаковка. Т-клетки 14E6 Lenti-X™ 293 высевали на чашке для культивирования Corning™ BioCoat™ Collagen I с круглым дном диаметром 150 мм^2 и инкубировали при 37 °C в течение ночи с использованием DMEM и 10% ФБС.

С помощью Т-клеток Lenti-X™ 293 при идеальной конфлюентности 80-85% подготавливали следующее. Культуральную среду заменяли на 21 мл среды для выращивания 293T. Липофектамин 2000 разводили при комнатной температуре и уравновешивали средой OptiMEM. Разведенный липофектамин 2000 добавляли по каплям к смешанным плазмидам и хорошо перемешивали. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 25 минут. Смесь для трансфекции добавляли к Т-клеткам Lenti-X

293T по каплям, причем планшет осторожно вращали для перемешивания. Смесь инкубировали в инкубаторе при 37 °C. Лентивирус собирали через 24 часа и 48 часов после трансфекции. Сводный обзор вышеуказанных реагентов приведен в **таблице 42.**

Таблица 42.

Реагенты	На чашку диаметром 15 см
pMDLg/p	18 мкг
pRSV.Rev	18 мкг
pMD2.G	7 мкг
Плазмида для переноса (CAR)	15 мкг
OptiMEM	1500 мкл

Лентивирус концентрировали следующим образом. Супернатанты, содержащие лентивирус, собирали и центрифугировали при 500 x g в течение 10 мин. При наличии избыточного количества Т-клеток 293T до фильтрации проводили фильтрацию через целлюлозно-ацетатный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Супернатант переносили в стерильный контейнер, смешивали с 1/3 объема реагента Lenti-X Concentrator (Clontech, кат. № 631232) и перемешивали посредством осторожного переворачивания. Смесь перемешивали при 4 °C в течение ночи. Образец центрифугировали при 1500 x g в течение 45 минут при 4 °C до появления белого плотного осадка, видимого после центрифугирования. Супернатант осторожно удаляли, не тревожа осадок. Остаточные супернатанты удаляли пипеткой после кратковременного центрифугирования при 1500 x g. Осадок осторожно повторно суспендировали в 1/10 исходного объема с использованием фактора роста Т-клеток. Вирус аликвотировали в 200 мкл и немедленно помещали на хранение при температуре -80 °C.

Вирусные титры устанавливали следующим образом. Лог-фаза роста клеток SupT1 проходила в полной среде RPMI. 100 мкл с концентрацией 20 000 клеток SupT1/мл высевали на лунку в плоском 96-луночном планшете. Затем проводили титрование вируса в 96-луночных круглодонных планшетах. Во все лунки планшета добавляли 100 мкл среды. Аликвоту вируса, хранящуюся в морозильном шкафу при -80 °C, размораживали. Аликвоту тщательно перемешивали с помощью пипетки в направлении вверх и вниз и добавляли 50 мкл вируса в первую лунку с последующим тщательным перемешиванием. Последовательное разведение в соотношении 1 : 3 проводили путем переноса 50 мкл вируса в следующую лунку с помощью пипетки. Затем 50 мкл среды добавляли только к первичному Ат, только вторичному Ат и не к нетрансдуцированным контрольным образцам. 50 мкл содержимого каждого соединения переносили с тировальной пластины к 100 мкл клеток SupT1 на аналитическом планшете для проведения анализа с помощью многоканальной пипетки и инкубировали при 37 °C в течение ночи. В каждый образец добавляли 100 мкл предварительно нагретой среды и инкубировали еще два дня. Эффективность трансдукции определяли методом проточной цитометрии. Образцы переносили на круглодонный 96-луночный планшет и центрифугировали при 1400 об/мин

в течение 3 минут. Супернатант быстро отбрасывали с последующим блоттингом для удаления избытков среды в вытяжном шкафу. Промывку повторяли с помощью 150 мкл буфера FACS. Затем приводили в действие протокол окрашивания, подходящий для конструктов CAR. Образцы повторно суспендировали в 150 мкл буфера FACS до проведения анализа методом проточной цитометрии.

Расчет титра вируса: титр=(% положительных CAR/100) x 2×104 x 20 x коэффициент разведения

Для исключения интеграции множественных копий используют титры с ближайшим значением трансдукции до 20%.

Активацию Т-клеток, трансдукцию и размножение проводили следующим образом. Флакон наивных Т-клеток размораживали на водяной бане и добавляли по каплям в коническую пробирку емкостью 15 мл, содержащую 9 мл предварительно нагретой среды для Т-клеток (TCM CTS OpTmizer T Cell Expanation SFM+5% человеческой сыворотки+100 МЕ/мл IL-2). Криофлакон промывали 1 мл среды для извлечения максимального количества и центрифугировали при 300 x g в течение 8 минут при комнатной температуре. Осадок повторно суспендировали в 10 мл свежей среды TCM, подсчитывали и повторно суспендировали до концентрации 1E6 клеток на миллилитр. 5E5 клеток на лунку высевали в 24-луночный планшет. $1,5\times10^6$ микроносители CD3/CD28 добавляли на лунку в объеме 500 мкл таким образом, что общий объем составлял 1 мл на лунку. Через сутки после активации вирус размораживали при комнатной температуре. Вирус добавляли при множественности инфекций (MOI), равной 3, осторожно перемешивали и возвращали планшет в инкубатор. (Лентивирусный функциональный титр ранее определяли с помощью анализа титра SupT1). Одна лунка была зарезервирована для нетрансдуцированного (UTD) соединения, в которую вирус не добавляли.

Через сутки после трансдукции, в каждую лунку добавляли 1 мл TCM. После этого добавляли пенициллин-стрептомицин (2-й день). На 3-й-5-й день добавляли 4 мл TCM в каждые 2 мл клеток и переносили в обработанную колбу для культур тканей T25. Колбы помещали горизонтально в инкубатор (3-й день). Равный объем TCM добавляли для культивирования Т-клеток (4-й день). В дни с 5 по 14 клетки проверяли через день, при этом регистрировали их жизнеспособность, размер и общее количество. Плотность клеток доводили до одного миллиона клеток на мл. Идеальное время сбора зависит от донора и определяется размером клеток и кратностью размножения. Клетки, как правило, замораживали, когда размер клеток составлял менее 8 мкм на основе проточного счетчика MOXI с 100-200-кратным размножением.

Эффективность лентивирусной трансдукции проверяли в день сбора клеток следующим образом. Культуры хорошо перемешивали. 100 мкл Т-клеток собирали в соответствующую лунку в 96-луночном планшете со 100 мкл буфера FACS, смешивали и центрифугировали при 1300 об/мин в течение 3 минут при комнатной температуре. Клетки повторно суспендировали в 200 мкл буферного раствора FACS и повторно

центрифугировали при 4 °C.

Через 14 дней после трансдукции клетки повторно суспендировали в 100 мкл биотина, меченного hK2 (1 мкг/мл, разбавленный буфером FACS) и инкубировали на льду в течение 30 минут. Добавляли 100 мкл буфера FACS и промывали центрифугированием при 4 °C. Промывание центрифугированием повторяли после добавления еще 200 мкл буфера FACS. Окрашивание с использованием 100 мкл основного раствора, содержащего вторичное антитело SA-PE (1 : 25 0), красителя для дифференциации живых/мертвых клеток (1: 500), αCD3, αCD4 и αCD8 антител проводили на льду в течение 30 минут. Добавляли 100 мкл буфера FACS и промывали центрифугированием при 4 °C, отбрасывали и повторно суспендировали в 200 мкл буфера FACS перед промывкой центрифугированием при 4 °C. Образцы повторно суспендировали в 100 мкл буфера FACS перед анализом методом проточной цитометрии.

Сбор клеток и замораживание проводили следующим образом. Определяли конечное количество клеток. Культуру собирали и центрифугировали при 300 x g в течение 10 минут при комнатной температуре. Культуру повторно суспендировали в меньшем объеме среды для внесения в коническую пробирку объемом 50 мл. Пробирки помещали в магниты при 4 °C в течение 10 минут до «отделения гранул». Клетки осторожно переносили из пробирки, чтобы свести к минимуму нарушения взаимосвязи микроноситель/магнит, а точный объем записывали. Подсчет повторяли. Центрифугирование проводили при 300 x g в течение 10 минут, при этом супернатант отбрасывали. Клетки замораживали в среде для криоконсервации клеток CS-10 CryoStor® в охлаждающем контейнере. Контейнеры немедленно переносили в условия температуры -80 °C на 24-48 часов перед отправкой на постоянное хранение в жидком азоте. Результаты показаны на **ФИГ. 27** и подтверждают экспрессию CAR hK2 на поверхности трансдуцированных Т-клеток. Краткие сведения о процентном содержании CAR+ Т-клеток hK2 (% положительных), обнаруженном с каждым из 10 термически стабилизированных клонов, и обзор анализа родительского HLH 11B6 представлены на фигуре. Результаты поверхностной экспрессии CAR17 (KL2B413_HL), CAR18 (KL2B413_LH), CAR19 (KL2B359_HL) и CAR20 (HK2B359_LH) показаны на **ФИГ. 27.** Как показано, различные клоны имеют разные уровни экспрессии CAR, которые находятся в диапазоне от 17,9% до 42,7%. Процент CAR-положительных CD3+ Т-клеток составил 56,0% для CAR17, 51,2% для CAR18, 45,1% для CAR19, 59,9% для CAR20 и 0,065% для нетрансдуцированных клеток (UTD на фигуре). Все CAR-Т-клетки были нормализованы к равным CAR+ Т-клеткам для последующих функциональных анализов.

Пример 11: Опосредованное CAR Т-клетками уничтожение опухолевых клеток-мишеней

Подсчет scFv CAR-Т-клеток проводили в анализе уничтожения опухолей в реальном времени с помощью системы визуализации IncuCyte на предмет антигензависимой цитотоксичности. Термически стабилизированные CAR-Т-клетки hK2 и родительские клетки 11B6 CAR-Т-клеток совместно инкубировали с клетками VCaP

(**ФИГ. 20**) или клетками PC3 (**ФИГ. 21**) в течение 88 часов при соотношении эффектор/мишень 1 : 1 или 0,5 : 1, которое рассчитывали на основании данных экспрессии CAR. CAR-T-клетки, трансдуцированные CAR17, CAR18, CAR19 и CAR20, совместно инкубировали с hK2-положительными клетками VCaP и hK2-отрицательными клетками DU145 в течение 96 часов при соотношении эффектор/мишень (E : T) 1 : 1 или 0,5 : 1, которое рассчитывали на основании экспрессии CAR на Т-клетках. Процент ингибирования роста опухолевых клеток с течением времени CAR-T-клетками, трансдуцированными CAR17, CAR18, CAR19 и CAR20, показан на **ФИГ. 30** для клеток VCap и на **ФИГ. 31** для клеток DU145. Клетки-мишени стабильно экспрессируют красный ядерный краситель, который измеряют с помощью системы визуализации IncuCyte в режиме реального времени. Ингибирование роста опухолевых клеток (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток*100 (%). Исследуемые CAR-T-клетки достигли приблизительно 100% ингибирования роста опухоли (TGI), тогда как нетрансдуцированный контроль не демонстрировал какого-либо TGI. В отношении исследуемых CAR-T-клеток в hK2-отрицательных DU145 клетках TGI не наблюдали.

Пример 12: Получение цитокинов с помощью термически стабилизированных scFv CAR-T-клеток

Супернатант собирали после совместного культивирования в течение ночи (приблизительно 20 часов) hK2 CAR-T-клеток с VCaP клетками при соотношении E/T, равном 1 : 1, анализировали с использованием набора 13-plex Milliplex Human High Sensitivity T cell (HSTCMAG28SPMX13). hK2 CAR модифицированные Т-клетки секретировали цитокины во время совместного культивирования с VCaP клетками, экспрессирующими hK2, но секреция была минимальной при использовании нетрансдуцированных Т-клеток (UTD). Результаты высвобождения цитокинов CAR-T-клетками hK2 показаны на **ФИГ. 22.**

Супернатант собирали после совместного культивирования в течение ночи (приблизительно 20 часов) CAR-T-клеток hK2 с клетками VCap, DU145 (5E4-клеток) при соотношении 1:1 E/T. CAR-T-клетки hK2, секретировали IFN-γ во время совместного культивирования с клетками VCap, экспрессирующими hK2, чего не происходило при совместном культивировании с hK2-отрицательными клетками DU145. В качестве положительного и отрицательного контролей использовались Т-клетки, стимулированные микроносителями CD3/CD28, и только Т-клетки, соответственно. Высвобождение ИФН-γ hK2 CAR-T-клетками показано на **ФИГ. 23.** Показана средняя концентрация IFN-γ ± SD (пг/мл) для культур при повторных измерениях. Различные термически стабилизированные CAR-T-клетки продуцировали другое количество IFN-γ при совместном культивировании с клетками hK2 (+) VCap.

Пример 13: Пролиферация CAR-T-клеток hK2

CAR-T-клетки hK2 оценивали в анализе пролиферации. Пролиферация Т-клеток является важным in vitro параметром иммунной функции in vivo. Для дополнительной

оценки функции термически стабилизированных CAR-T-клеток термически стабилизированные 11B6 и исходные scFv CAR-T-клетки метили CTV для оценки пролиферации T-клеток.

hK2 CAR-T-клетки и нетрансдуцированные (UTD) T-клетки метили с помощью красителя CellTrace Violet (CTV; 5 мкм) и совместно культивировали с hK2-положительными клетками VCap и hK2-отрицательными клетками DU145. Через пять дней после совместного культивирования клетки собирали и окрашивали с помощью CD3, CD25, красителя для дифференциации живых/мертвых клеток (NearIR live/dead Dye) и CAR hK2. Анализ методом проточной цитометрии проводили на проточном цитометре Fortessa с программным обеспечением Flowjo. Лимфоциты идентифицировали с помощью живых CD3, и определяли частоты CAR-T-клеток с помощью разведения красителя CTV и маркера активации CD25. Путем гейтирования на CAR+ T-клетках hK2, как было показано, клетки hK2 (+) Vcap, но не hK2 (-) клетки DU145 стимулировали пролиферацию всех T-клеток, созданных с конструктами CAR (**ФИГ. 33**) и повышали активацию маркера CD25 (**ФИГ. 34**). В качестве положительного и отрицательного контролей использовались T-клетки, стимулированные микроносителями CD3/CD28, и только T-клетки, соответственно. T-клетки без какой-либо стимуляции не пролиферировали, и микроносители CD328 стимулировали T-клетки, демонстрируя эквивалентную картину пролиферации. Как показано на **ФИГ. 35**, hK2 CAR-T-клетки пролиферировали более устойчиво, чем положительный контроль с микроносителями CD3/CD28 после 5 дней совместного культивирования с VCaP клетками. T-клетки, сконструированные с помощью различных конструктов CAR, имеют другую активность пролиферации и демонстрировали различные количества CAR-положительных T-клеток. Количество CAR-положительных T-клеток получают на основании среднего значения абсолютного количества клеток - /-SEM из трех технических повторов.

Использовали следующий протокол. Опухолевые клетки VCap и DU145 собирали, дважды промывали PBS и повторно суспендировали при 10E6/мл в PBS, содержащем 100 мкг/мл митомицина C (MMC), в течение 1,5 часов в инкубаторе при 37°C, чтобы блокировать пролиферацию опухолевых клеток. 20 мкл DMSO добавляли во флакон раствора для окрашивания CTV. 5 мкл раствора разводили 5 мл (1:1000) PBS (нагретым до 37 °C) для получения 5 мкМ раствора для окрашивания. 2E6 T-клетки подсчитывали, собирали, дважды промывали PBS и повторно суспендировали в 4E6/мл (0,5 мл). Добавляли равный объем (0,5 мл) раствора для окрашивания CTV. Затем образцы инкубировали в течение 20 часов при 37 °C. Затем в клетки добавляли 4 мл PRMI+20% FBS для абсорбции любого несвязанного красителя. Клетки инкубировали в течение 5 минут и центрифугировали 5 минут при 400 x g. Клеточный осадок повторно суспендировали в предварительно нагретом RPMI+10% FBS. Проводили подсчет T-клеток. А 1E5 клетки (100 мкл) высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном.

В то же время опухолевые клетки hK2 (+) VCap и HK2(-) DU145, обработанные MMC, собирали и подсчитывали через 1,5 часа, а затем повторно суспендировали при

1E6/мл. 1E5 клеток (100 мкл) культивировали с Т-клетками в 96-луночном планшете. В качестве отрицательных и положительных контролей использовали только Т-клетки и Т-клетки с добавленными микроносителями CD3/28 в соотношении микроносителей к клеткам 3 : 1.

Через 5 дней совместного культивирования собирали все клетки з каждой лунки. Клетки дважды центрифугировали и промывали в течение 5 минут при 400 x g, затем окрашивали с помощью hK2CAR, CD3, CD8 и CD25, красителя для дифференциации живых/мертвых клеток (ближний ИК) в 96-луночном планшете с U-образным дном. После промывки все клетки фиксировали в течение 10 минут с использованием 100 мкл буфера для фиксации BD Cytofix™ (50 мкл буфера FACS+50 буфера для фиксации). Окрашенные образцы анализировали с помощью многоцветной проточной цитометрии после завершения периода инкубации.

Анализ данных выполняли следующим образом. Получали гистограмму CTV. Неразбавленный гейт CTV был установлен таким образом, чтобы охватить крайний правый пик (CTV bright) Т-клеток, культивируемых отдельно, и разбавленный гейт CTV для захвата остальной части популяции. Это применяли ко всем образцам.

Пример 14. Определение характеристик CAR-Т-клеток, трансдуцированных CAR17, CAR18, CAR19 или CAR20.

Активация CAR-Т-клеток является антигензависимой

Полученные CAR-Т-клетки оценивали в анализе JNL-репортера на предмет антигензависимой активности, как описано в примере 5. Вкратце, клетки Jurkat, содержащие ген люциферазы, активируемый сигнально-чувствительным промотором NFAT (называемые клетками JNL), были трансдуцированы конструктами CAR17 (KL2B413_HL), CAR18 (KL2B413_LH), CAR19 (KL2B359_HL) или CAR20 (KL2B359_LH). Экспрессию каждого CAR определяли с помощью биотинилированного hK2, затем конъюгированного с стрептавидином PE. Экспрессия CAR в трансдуцированных клетках JNL была подтверждена для выбранных клонов с 46-50% клеток, экспрессирующих CAR, на основании KL2B359, и 73,7-96% клеток, экспрессирующих CAR, на основании KL2B413, как показано на **ФИГ. 28**. Процент клеток JNL, экспрессирующих каждый CAR, был следующим: CAR17 (KL2B413_HL): 73,7% CAR18 (KL2B413_LH): 93,6%, CAR19 (KL2B359_HL): 46%, CAR20 (KL2B359_LH): 50,8%.

Связывание между конструктом CAR hK2 и распознанным им клеточным антигеном (hK2 на клетках-мишенях) приводит к экспрессии люциферазы в клетках JNL С этой целью клетки JNL, трансдуцированные исследуемыми конструктами CAR или нетрансдуцированными клетками JNL (UTD), совместно культивировали с клетками-мишенями (VCap, LNCaP/hK2 (клетки LNCaP, рекомбинантно экспрессирующие hK2), LNCaP, C 4-2B, 22Rv1 или DU145 клетки), а активность люциферазы измеряли как интенсивность люминесценции. Конструкты считали активными, когда интенсивность люминесценции в присутствии экспрессирующих антиген клеток превышала уровень

UTD-клеток в 1,5 раза. Для исследуемых конструктов CAR не было обнаружено антигензависимой активации. На **ФИГ. 29** показаны RLU (относительные световые единицы), полученные в результате связывания CAR-T-клеток с исследуемыми клетками-мишенями, указанными на фигуре.

CAR-T-клетки опосредуют уничтожение опухолевых клеток антигензависимым образом

CAR-T-клетки, трансдуцированные CAR17, CAR18, CAR19 и CAR20, совместно инкубировали с hK2-положительными клетками VCaP и hK2-отрицательными клетками DU145 в течение 96 часов при соотношении эффектор/мишень (E : T) 1 : 1 или 0,5 : 1, которое рассчитывали на основании экспрессии CAR на Т-клетках (Пример 11). Клетки-мишени стабильно экспрессируют красный ядерный краситель, который измеряют с помощью системы визуализации IncuCyte в режиме реального времени. Процент ингибирования роста опухолевых клеток с течением времени показан на **ФИГ. 30** для клеток VCap и на **ФИГ. 31** для клеток DU145. Ингибирование роста опухолевых клеток (TGI) (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток*100 (%). Исследуемые CAR-T-клетки достигли приблизительно 100% ингибирования роста опухоли (TGI), тогда как нетрансдуцированный контроль не демонстрировал какого-либо TGI. В отношении исследуемых CAR-T-клеток в hK2-отрицательных DU145 клетках TGI не наблюдали.

CAR-T-клетки продуцируют цитокины при антиген-зависимой стимуляции

ИФН-γ, продуцируемый цитотоксическими Т-клетками, имеет решающее значение для обеспечения иммунного надзора над опухолями, что может непосредственно ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз некоторых злокачественных новообразований in vivo и in vitro. Для определения способности hK2 CAR-модифицированных человеческих Т-клеток распознаваться и активироваться с помощью hK2-положительных опухолевых клеток, первичные Т-клетки, трансдуцированные указанными клонами CAR, совместно культивировали с линиями клеток-мишеней (LNCaP/hK2, LNCaP, C 4-2B, 22Rv1 или DU145 клетки), а супернатант собирали для измерения концентрации IFN-γ. Как показано в **ФИГ. 32**, CAR-T-клетки, трансдуцированные клетками hK2 CAR, секретировали IFN-γ во время совместного культивирования с клетками LNCap, рекомбинантно экспрессирующими hK2 (LNCap/hK2) клетками, а также во время совместного культивирования с клетками C 4-2B с очень низкой экспрессией hK2 и клетками LNCap, чего не отмечалось с hK2-отрицательными клетками DU145. На фигуре показана средняя концентрация IFN-γ ± SD (пг/мл) для культур в двух повторностях.

CAR-T-клетки активируют и повышают активность маркеров дегрануляции антигензависимым образом

Опухолевые клетки могут быть распознаны и уничтожены цитотоксическими лимфоцитами, такими как CD8+ Т-лимфоциты и натуральные киллеры (NK), в основном

посредством иммунной секреции литических гранул, которые уничтожают опухолевые клетки-мишени. Этот процесс включает в себя слияние мембраны гранул с цитоплазматической мембраной иммунной эффекторной клетки, что приводит к выходу на поверхность лиосомальных белков, которые обычно присутствуют на липидных бислоях, окружающих литические гранулы, такие как CD107a. Таким образом, экспрессия мембраны CD107a представляют собой маркер активации иммунных клеток и цитотоксической дегрануляции.

Анализ дегрануляции проводили так, как описано ниже. Клетки-мишени (5×10^4) совместно культивировали с равным количеством эффекторных клеток в 0,1 мл на лунку в 96-луночном планшете. Контрольные лунки содержали только Т-клетки. Антитела к CD107a (5 мкл на лунку) добавляли в дополнение к 1 мкл/образец монензина (BD Biosciences) и инкубировали в течение 4 часов при 37 °C. Клетки дважды промывали PBS, окрашивали для экспрессии CAR, CD3 и CD8 hK2 и анализировали на проточном цитометре BD Fortessa.

Результаты анализа PAR представлены на **ФИГ. 33**. Увеличение количества CD107A+ hK2 CAR-Т-клеток было очевидным в совместных культурах с hK2-положительным клетками Vcap, тогда как совместное культивирование с hK2-отрицательными клетками DU145 не оказывало влияния. Наблюдалось только фоновое окрашивание (< 2%) в CAR-Т-клетках без стимуляции опухолевых клеток и в контрольных UTD. Форбол 12-миристат 13-ацетат (PMA) в комбинации с иономицином (eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail;500X) был постоянным индуктором поверхностной экспрессии клеток CD107a в данной 4-часовой модели культивирования клеток, которую использовали в качестве положительного контроля. Результаты показаны для репрезентативных донорских Т-клеток и воспроизводились с разными донорами.

CAR Т-клетки пролиферируют антигензависимым образом

CAR-Т-клетки оценивали на предмет их пролиферации с использованием протокола анализа пролиферации Т-клеток, описанного в примере 9. hK2 CAR-Т-клетки и нетрансдуцированные (UTD) Т-клетки метили CellTrace Violet (CTV; 5μM) и совместно культивировали с hK2-положительными VCap и hK2-отрицательными DU145-клетками. Через пять дней после совместного культивирования клетки собирали и окрашивали с помощью CD3, CD25, красителя для дифференциации живых/мертвых клеток (NearIR live/dead Dye) и CAR hK2. Анализ методом проточной цитометрии проводили на проточном цитометре Fortessa с программным обеспечением Flowjo. Лимфоциты идентифицировали с помощью живых CD3, и определяли частоты CAR-Т-клеток с помощью разведения красителя CTV и маркера активации CD25. Путем гейтирования на CD3+ Т-клетках hK2-положительные клетки Vcap, в отличие от hK2-отрицательных клеток DU145, способствовали пролиферации каждой исследованной линии CAR-Т-клеток, как показано на **ФИГ. 34** и **ФИГ. 35,** и усилению активации маркера активации CD25, как показано на **ФИГ. 36** и **ФИГ. 37**. Т-клетки без какой-либо стимуляции не пролиферировали, и микроновители CD328 стимулировали Т-клетки, демонстрируя

эквивалентную модель пролиферации. hK2 CAR+ Т-клетки пролиферировали более устойчиво, чем положительный контроль с микроносителями CD328 после 5 дней совместного культивирования с клетками VCap. Различные исследованные CAR-Т-клетки имели отличную активность пролиферации и демонстрировали различные количества CAR-Т-клеток. Процент пролиферирующих Т-клеток и Т-клеток, экспрессирующих CD25, рассчитывают по среднему абсолютному числу клеток +/- SEM после двух повторений.

Пример 15: Создание и определение характеристик ADC

Антитела или антигенсвязывающие домены, которые связывают hK2, маркируют различными радиоактивными металлами, такими как In-111, Zr-89 или Lu-177 Ac-225, и биораспределение в опухоли in vivo, или эффективность, оценивают в моделях с прижившимися подкожными (п/к) имплантатами предстательной железы человека, включая LNCaP, VCaP или C 4-2B, у самцов NOD, Cg-Prkdc^{scd}Il2rg^{tm1Wjl}/SJ (NSG, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) или у мышей линии Balb-c или SHO Nech. Различные дозы антител или антигенсвязывающих доменов, которые связываются с антителами к hK2 или антителами изотипического контроля, метят различными количествами радиоактивности (10-1000 nCi) и измеряют накопление в опухоли или эффективность.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает родственную калликреину пептидазу 2 (hK2), где указанный антигенсвязывающий домен связывается с эпитопом на hK2, имеющим последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 111, 112, 113, 114, и 115.

2. Выделенный белок по п. 1, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, связывает hK2 в эпитопах, имеющих последовательности KVTEF (SEQ ID NO: 111) или HYRKW (SEQ ID NO: 112).

3. Выделенный белок по п. 1, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конкурирует за связывание с hK2 с эталонным антителом, где эталонное антитело содержит:

a. HCDR1, HCDR2 HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 137 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 138; или

b. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 162 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163; или

c. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 164 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 165; или

d. HCDR1, HCDR2 HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 166 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 167; или

e. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 168 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 169; или

f. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 204 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 205; или

g. HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 166 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 444.

4. Выделенный белок по п. 3, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конкурирует за связывание с hK2 с эталонным антителом, где эталонное антитело содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 162 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 163.

5. Выделенный белок по п. 1-4, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 SEQ ID NO:

a. SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

b. SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

c. SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно;

d. SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186, и 187, соответственно;

e. SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно;

f. SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, и 209, соответственно;

g. SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

h. SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

i. SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 180, и 181, соответственно;

j. SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186 и 187, соответственно;

k. SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192 и 193, соответственно; или

l. SEQ ID NO: 216, 217, 218, 182, 470 и 209, соответственно.

6. Выделенный белок по п. 5, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

7. Выделенный белок по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

8. Выделенный белок по п. 7, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой Fab.

9. Выделенный белок по п. 7, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой VHH.

10. Выделенный белок по п. 7, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv.

11. Выделенный белок по п. 10, где scFv содержит, от N- до C-конца, VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

12. Выделенный белок по п. 11, где L1 содержит:

a. около 5-50 аминокислот;

b. около 5-40 аминокислот;

c. около 10-30 аминокислот; или

d. около 10-20 аминокислот.

13. Выделенный белок по п. 12, L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 или 108.

14. Выделенный белок по п. 13, где L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

15. Выделенный белок по любому из пп. 1-14, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 137, 162, 164, 166, 168 или 204 и VL SEQ ID NO: 138, 163, 165, 167, 169 или 205.

16. Выделенный белок по п. 15, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит:

a. VH с SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138; или

b. VH с SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163; или

c. VH с SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165; или

d. VH с SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167; или

e. VH с SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169; или

f. VH с SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205; или

g. VH SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 444.

17. Выделенный белок по п. 15, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

18. Выделенный белок по любому из пп. 1-17, в котором антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 133, 134, 308, 316, 324, 325, 404, 405, 406, 407, 408 и 409.

19. Выделенный белок по любому из пп. 1-17, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 404 или 405.

20. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с родственной калликреину пептидазой 2 (hK2), где антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) последовательности SEQ ID NO: 75 и вариабельную область легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 74.

21. Выделенный белок по п. 20, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 4, 5, 6, 139, 159 или 161 и VL SEQ ID NO: 1, 2, 3,140 или 160 при условии, что антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, не содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 2.

22. Выделенный белок по п. 21, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит:

a. VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1;

b. VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2;

c. VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3;

d. VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 140;

e. VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 160;

f. VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1;

g. VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3;

h. VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 140;

i. VH c SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 160;

j. VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1;

k. VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2;

l. VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3;

m. VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 140;

n. VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 160;

o. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 1;

p. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 2;

q. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 3;

r. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140;

s. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 160;

t. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 1;

u. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 2;

v. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 3;

w. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140;

x. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160;

y. VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 1;

z. VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 2;

aa. VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 3;

bb. VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140; или

cc. VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 160.

23. Выделенный белок по любому из пп. 20-22, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

a. SEQ ID NO: 63, 64, 66, 67, 69 и 71, соответственно;

b. SEQ ID NO: 63, 65, 66, 68, 70 и 71, соответственно;

c. SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно;

d. SEQ ID NO: 72, 73, 66, 67, 69 и 71, соответственно; или

e. SEQ ID NO: 72, 73, 66, 68, 70 и 71, соответственно; или

f. SEQ ID NO: 72, 73, 66, 67, 69 и 71, соответственно.

24. Выделенный белок по п. 21, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

25. Выделенный белок по п. 24, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой Fab.

26. Выделенный белок по п. 24, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой VHH.

27. Выделенный белок по п. 24, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv.

28. Выделенный белок по п. 27, где scFv содержит, от N- до C-конца, VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

29. Выделенный белок по п. 28, где L1 содержит:

a. около 5-50 аминокислот;

b. около 5-40 аминокислот

c. около 10-30 аминокислот;

d. или около 10-20 аминокислот.

30. Выделенный белок по п. 29, где L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 или 108.

31. Выделенный белок по любому из пп. 21-30, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 135, 136, 318, 319, 320, 321, 322 или 323.

32. Выделенный белок по любому из пп. 1-31, где выделенный белок представляет собой моноспецифический белок.

33. Выделенный белок по любому из пп. 1-31, где выделенный белок представляет собой мультиспецифический белок.

34. Выделенный белок по п. 33, где мультиспецифический белок представляет собой биспецифический белок.

35. Выделенный белок по п. 33, где мультиспецифический белок представляет собой трипецифический белок.

36. Мультиспецифический белок по п. 34 или 35, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген.

37. Выделенный белок по п. 36, где лимфоцит представляет собой Т-клетку.

38. Выделенный белок по п. 37, где Т-клетка представляет собой Т-клетку $CD8^+$.

39. Мультиспецифический белок по п. 38, где лимфоцит представляет собой клетку-натуральный киллер (NK).

40. Мультиспецифический белок по любому из пп. 36, где лимфоцитарный антиген представляет собой CD3, эпсилон CD3 (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195 или NKG2C.

41. Мультиспецифический белок по п. 40, где лимфоцитарный антиген представляет собой CD3ε.

42. Мультиспецифический белок по п. 41, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит

a. определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1) SEQ ID NO: 116, HCDR2 SEQ ID NO: 117, HCDR3 SEQ ID NO: 118, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) SEQ ID NO: 119, LCDR2 SEQ ID NO: 120 и LCDR3 SEQ ID NO: 121; или

b. VH с SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123.

43. Мультиспецифический белок по п. 41, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 157.

44. Мультиспецифический белок по п. 43, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит

a. определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1) SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259, и LCDR3 SEQ ID NO: 260; или

b. HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259, и LCDR3 SEQ ID NO: 261; или

c. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 249; или

d. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 250; или

e. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251; или

f. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 252; или

g. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 253; или

h. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 254.

45. Мультиспецифический белок по п. 43, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259, и LCDR3 SEQ ID NO: 261.

46. Мультиспецифический белок по п. 43 или п. 45, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VH SEQ ID NO: 248, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VL SEQ ID NO: 251.

47. Мультиспецифический белок по любому из пп. 41-46, где связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

a. SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

b. SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

c. SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно;

d. SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186 и 187, соответственно;

e. SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно;

f. SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470 и 209, соответственно;

g. SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

h. SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

i. SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 190 и 181, соответственно;

j. SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186 и 187, соответственно;

k. SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192 и 193, соответственно;

l. SEQ ID NO: 216, 217, 218, 182, 470, и 209, соответственно;

m. SEQ ID NO: 63, 64, 66, 67, 69 и 71, соответственно;

n. SEQ ID NO: 63, 65, 66, 68, 70 и 71, соответственно;

o. SEQ ID NO: 72, 73, 66, 67, 69 и 71, соответственно;

p. SEQ ID NO: 72, 73, 66, 68, 70 и 71, соответственно;

q. VH SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138;

r. VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163;

s. VH SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165;

t. VH SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167;

u. VH SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169;

v. VH SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205;

w. VH SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 444;

x. VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3;

y. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140;

z. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140;

aa. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160; или

bb. VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 160.

48. Мультиспецифический белок по п. 47, где связывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

49. Мультиспецифический белок по любому из пп. 41-48, где связывающий домен, который связывает CD3, содержит

a. HCDR1 SEQ ID NO: 116, HCDR2 SEQ ID NO: 117, HCDR3 SEQ ID NO: 118, LCDR1 SEQ ID NO: 119, LCDR2 SEQ ID NO: 120 и LCDR3 SEQ ID NO: 121; или

b. HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259, и LCDR3 SEQ ID NO: 260; или

c) HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261; или

d. VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 249; или

e. VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 250; или

f. VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251; или

g. VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 252; или

h. VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 253; или

i. VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 254; или

j. VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123.

50. Выделенный белок по любому из пп. 1-49, где белок конъюгирован с фрагментом, продлевающим период полужизни.

51. Выделенный белок по п. 50, где фрагмент, продлевающий период полужизни, представляет собой иммуноглобулин (Ig), фрагмент Ig, константную область Ig, фрагмент константной области Ig, Fc-область, трансферрин, альбумин, альбумин-связывающий домен или полиэтиленгликоль.

52. Выделенный белок по п. 51, где фрагмент константной области Ig содержит Fc-область.

53. Выделенный белок по п. 52, где фрагмент константной области Ig содержит

домен CH2.

54. Выделенный белок по п. 52, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH3.

55. Выделенный белок по п. 52, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

56. Выделенный белок по п. 55, где фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнирной области, домен CH2 и домен CH3.

57. Выделенный белок по п. 56, где фрагмент константной области Ig содержит шарнирную область, домен CH2 и домен CH3.

58. Выделенный белок по любому из пп. 50-57, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с N-концом константной области Ig или фрагментом константной области Ig.

59. Выделенный белок по любому из пп. 50-57, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с C-концом константной области Ig или фрагментом константной области Ig.

60. Выделенный белок по любому из пп. 50-57, где антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, конъюгирован с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig посредством второго линкера (L2).

61. Выделенный белок по п. 60, где L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 или 108.

62. Выделенный белок по любому из пп. 51-61, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 изотип.

63. Выделенный белок по п. 62, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой IgG1.

64. Выделенный белок по любому из пп. 51-63, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению связывания белка с Fcγрецептором (FcγR).

65. Выделенный белок по п. 64, где по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению связывания белка с FcγR, выбирают из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-делеция/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/G236-делеция/G237A/P238S, где нумерация остатков соответствует индексу EC.

66. Выделенный белок по п. 65, где мутации, которые приводят к снижению связывания белка с FcγR, представляют собой L234A_L235A_D265S.

67. Выделенный белок по пп. 51-66, где константная область Ig или фрагмент

константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR.

68. Выделенный белок по п. 67, где по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR, выбирают из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, где нумерация остатков соответствует индексу EC.

69. Выделенный белок по любому из пп. 64-68, где FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

70. Выделенный белок по любому из пп. 51-63, где константная область Ig фрагмента константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни белка.

71. Выделенный белок по п. 70, где по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полувыведения белка, выбирают из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, где нумерация остатков соответствует индексу EC.

72. Выделенный белок по любому из пп. 51-63, где указанный белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 константной области Ig.

73. Выделенный белок по п. 72, где по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 константной области выбирали из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, где нумерация остатков соответствует индексу EC.

74. Выделенный белок по п. 73, где мутации в домене CH3 константной области Ig представляют собой T350V_T366L_K392L_T394W или T350V_L351Y_F405A_Y407V.

75. Выделенный белок по п. 73 или 74, где константная область IgG содержит SEQ ID: 109, 110, 158 или 378.

76. Выделенный белок по п. 75, где константная область IgG содержит SEQ ID NO: 109 или 378.

77. Выделенный белок по любому из пп. 1-18 или 50-76, содержащий

a. тяжелую цепь (HC) SEQ ID NO: 210 и легкую цепь (LC) SEQ ID NO: 221;

b. VH SEQ ID NO: 211 и LC SEQ ID NO: 222;

c. VH SEQ ID NO: 212 и LC SEQ ID NO: 223;

d. VH SEQ ID NO: 213 и LC SEQ ID NO: 224; или

e. HC SEQ ID NO: 219 и LC SEQ ID NO: 220.

78. Выделенный белок по любому из пп. 1-76, содержащий HC, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична SEQ ID NO: 354,

и LC, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична SEQ ID NO: 221.

79. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, где антигенсвязывающий домен содержит:

a. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно; и/или

b. VH с SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163; и/или

c. HC SEQ ID NO: 210 и LC SEQ ID NO: 221.

80. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, где антигенсвязывающий домен содержит:

a. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно; и/или

b. VH с SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163; и/или

c. HC SEQ ID NO: 354 и LC SEQ ID NO: 221.

81. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, где антигенсвязывающий домен содержит

a. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно; и/или

b. VH с SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165; и/или

c. HC SEQ ID NO: 211 и LC SEQ ID NO: 222.

82. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, где антигенсвязывающий домен содержит

a. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186 и 187, соответственно; и/или

b. VH с SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167; и/или

c. HC SEQ ID NO: 212 и LC SEQ ID NO: 223.

83. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, где антигенсвязывающий домен содержит

a. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно; и/или

b. VH с SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169; и/или

c. HC SEQ ID NO: 213 и LC SEQ ID NO: 224.

84. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, где антигенсвязывающий домен содержит

a. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470 и 209, соответственно; и/или

b. VH с SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205; и/или

c. HC SEQ ID NO: 219 и LC SEQ ID NO: 220.

85. Выделенный белок по любому из пп. 79-84, где белок представляет собой

химерный антигенный рецептор (CAR).

86. Выделенный белок по любому из пп. 79-84, где выделенный белок представляет собой мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε.

87. Мультиспецифический белок по п. 86, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит

a. определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1) SEQ ID NO: 116, HCDR2 SEQ ID NO: 117, HCDR3 SEQ ID NO: 118, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) SEQ ID NO: 119, LCDR2 SEQ ID NO: 120 и LCDR3 SEQ ID NO: 121; или

b. VH с SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123.

88. Мультиспецифический белок по п. 86 или 87, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 157.

89. Мультиспецифический белок по п. 86 или 87, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит:

a. определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1) SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259, и LCDR3 SEQ ID NO: 260; или

b. HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259, и LCDR3 SEQ ID NO: 261; или

c. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 249; или

d. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 250; или

e. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251; или

f. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 252; или

g. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 253; или

h. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 254.

90. В мультиспецифический белок по п. 86, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259, и LCDR3 SEQ ID NO: 261.

91. Мультиспецифический белок по п. 86 или п. 90, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VH SEQ ID NO: 248, и VL, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VL SEQ ID NO: 251.

92. Выделенный белок по любому из пп. 1-32, где белок представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

93. Выделенный белок по п. 92, где CAR содержит:

a. внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 по любому из пп. 1-32;

b. трансмембранный домен; и

c. внутриклеточный сигнальный домен, необязательно содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

94. Выделенный белок по п. 92 или 93, где CAR дополнительно содержит шарнирную область CD8a.

95. Выделенный белок по любому из пп. 92-94, где

a. шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25;

b. трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26; и/или

C. внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующий домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, и первичный сигнальный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28.

96. Выделенный белок антитела к hK2/CD3, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген.

97. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 96, где лимфоцитарный антиген представляет собой Т-клеточный антиген.

98. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 97, где Т-клеточный антиген представляет собой $CD8^+$ Т-клеточный антиген.

99. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 98, где лимфоцитарный антиген представляет собой антиген NK-клеток.

100. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из пп. 96-99, где лимфоцитарный антиген представляет собой CD3, эпсилон CD3 (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195 или NKG2C.

101. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 100, где лимфоцитарный антиген представляет собой CD3ε.

102. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из пп. 96-100, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2 и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

103. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 102, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, и/или второй антигенсвязывающий

домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержат Fab.

104. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 102, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержат VHH.

105. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 102, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержат scFv.

106. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 102, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит Fab, а второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv.

107. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 105 или 106, где scFv содержит, от N- до C-конца, VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

108. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 107, где L1 содержит

a. около 5-50 аминокислот;

b. около 5-40 аминокислот;

c. около 10-30 аминокислот; или

d. около 10-20 аминокислот.

109. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 108, где L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 или 108.

110. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 109, где L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

111. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из пп. 96-110, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, специфически связывается с эпитопом на hK2, приведенном в SEQ ID NO: 111, 112, 113, 114, или 115.

112. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 111, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, специфически связывается с эпитопом на hK2, приведенном в SEQ ID NO: 111 и 112.

113. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 111 или 112, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, специфически связывается с прерывающимся эпитопом на hK2, содержащей одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, содержащей SEQ ID NO: 111, 112, 113, 114, и 115.

114. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из пп. 96-113, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, специфически связывается с эпитопом на hK2, приведенном в SEQ ID NO: 341, 448 или 449.

115. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 114, где второй антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, специфически связывается с

прерывающимся эпитопом на CD3ε, содержащем одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, содержащей SEQ ID NO: 341, 448 и 449.

116. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 115, где второй антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, специфически связывается с эпитопом на CD3, приведенном в SEQ ID NO: 341, 448 и 449.

117. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из пп. 96-116, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 63, 72, 141, 147, 170, 176, 188, 194, 196, 198, 200, 206 или 216, HCDR2 SEQ ID NO: 64, 65, 73, 142, 148, 171, 177, 189, 195, 197, 199, 201, 207 или 217, HCDR3 SEQ ID NO: 66, 143, 172, 178, 184, 190, 208 или 218, LCDR1 SEQ ID NO: 67, 68, 144, 173, 179, 182, 185 или 191, LCDR2 SEQ ID NO: 69, 70, 145, 174, 180, 186, 192 или 470 и LCDR3 of SEQ ID NO: 71, 146, 175, 181, 187, 193 или 209.

118. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по 117, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

a. SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

b. SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

c. SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно;

d. SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186 и 187, соответственно;

e. SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно;

f. SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470 и 209, соответственно;

g. SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

h. SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

i. SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 190 и 181, соответственно;

j. SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186 и 187, соответственно;

k. SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192 и 193, соответственно; или

l. SEQ ID NO: 216, 217, 218, 181, 470 и 209, соответственно.

119. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по 118, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно.

120. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 118, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит

a. VH с SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138;

b. VH с SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163;

c. VH с SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165;

d. VH с SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167;

e. VH с SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169;

f. VH с SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205; или

g. VH с SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 444.

121. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из пп. 117-119, где первый

антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VL SEQ ID NO: 163.

122. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из пп. 96-115, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 75 и VL SEQ ID NO: 74.

123. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 122, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 4, 5, 6, 137, 139, 159 или 161 и VL SEQ ID NO: 1, 2, 3, 140 или 160, при условии, что антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, не содержит VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 2.

124. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 123, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO:

a. VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1;
b. VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2;
c. VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3;
d. VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 140;
e. VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 160;
f. VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1;
g. VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3;
h. VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 140;
i. VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 160;
j. VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1;
k. VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2;
l. VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3;
m. VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 140;
n. VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 160;
o. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 1;
p. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 2;
q. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 3;
r. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140;
s. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 160;
t. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 1;
u. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 2;
v. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 3;
w. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140;
x. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160;

y. VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 1;

z. VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 2;

aa. VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 3;

bb. VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140; или

cc. VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 160.

125. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 124, отличающийся тем, что указанный первый антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 133, 134, 135, 136, 308, 316, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 404, 405, 406, 407, 408 или 409.

126. Выделенный белок по п. 124, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 404 или 405.

127. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из пп. 96-125, где второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 255 или 116, HCDR2 SEQ ID NO: 256 или 117, HCDR3 SEQ ID NO: 257 или 118, LCDR1 SEQ ID NO: 258 или 119, LCDR2 SEQ ID NO: 259 или 120, LCDR3 SEQ ID NO: 260, 261 или 121;

128. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 126, где второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261.

129. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по пп. 126-127, где второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 157.

130. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 128 или 129, где второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит

a. HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259, и LCDR3 SEQ ID NO: 260;

b. HCDR1 SEQ ID NO: 255, HCDR2 SEQ ID NO: 256, HCDR3 SEQ ID NO: 257, LCDR1 SEQ ID NO: 258, LCDR2 SEQ ID NO: 259 и LCDR3 SEQ ID NO: 261;

c. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 249;

d. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 250;

e. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251;

f. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 252;

g. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 253; или

h. VH с SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 254.

131. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 129, где второй

антигенсвязывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VH SEQ ID NO: 248, и VL, которая по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VL SEQ ID NO: 251.

132. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из пп. 96-126, где второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит

a. HCDR1 SEQ ID NO: 116, HCDR2 SEQ ID NO: 117, HCDR3 SEQ ID NO: 118, LCDR1 SEQ ID NO: 119, LCDR2 SEQ ID NO: 120 и LCDR3 SEQ ID NO: 121; или

b. VH с SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123.

133. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 132, где второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336 или 337.

134. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по пп. 96-132, где второй антигенсвязывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 331.

135. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по одному из пп. 96-134, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, конъюгирован с первой константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом первой константной области Ig, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, конъюгирован со второй константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом второй константной области Ig.

136. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 135 дополнительно содержит второй линкер (L2) между первым антигенсвязывающим доменом, который связывает hK2, и первой константной областью Ig или фрагментом первой константной области Ig, и между вторым антигенсвязывающим доменом, который связывает лимфоцитарный антиген, и второй константной областью Ig или фрагментом второй константной области Ig.

137. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 136, где L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 или 108.

138. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 137, где фрагмент константной области Ig содержит Fc-область.

139. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 138, где фрагмент константной

области Ig содержит домен CH2.

140. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 139, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH3.

141. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 140, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

142. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 141, где фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнирной области, домен CH2 и домен CH3.

143. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 142, где фрагмент константной области Ig содержит шарнирную область, домен CH2 и домен CH3.

144. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 138, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig представляют собой IgG1, IgG2 и IgG3 или изотип IgG4.

145. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 144, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig представляют собой IgG1.

146. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 145, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению связывания мультиспецифического белка с FcγR.

147. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 146, где по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбирают из группы, состоящей из F234A/L235A, F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-делеция/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/G236-делеция/G237A/P238S, где нумерация остатков соответствует индексу EC.

148. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 147, где мутации, которые приводят к снижению связывания мультиспецифического белка с FcγR представляет собой L234A_L235A_D265S.

149. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 144, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с Fcγ-рецептором (FcγR).

150. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 149, где по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбирают из группы, состоящей из S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L,

F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, где нумерация остатков соответствует индексу EC.

151. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из пп. 146-150, где FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

152. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 144, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка.

153. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 152, где по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка, выбирают из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376 V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, где нумерация остатков соответствует индексу EU.

154. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из пп. 152 или 153, содержащий по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig.

155. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 154, где по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одной мутации в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig, выбирают из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, где нумерация остатков соответствует индексу EC.

156. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 155, где мутации в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и мутации в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig представляют собой T350V_T366L_K392L_T394W или T350V_L351Y_F405A_Y407V, соответственно.

157. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из пп. 135-156, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержит следующие мутации

a. L234A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V в первой константной области Ig и L234A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W во второй константной области Ig; или

b. L234A_L235A_D265S_T350 V_T366L_K392L_T394W в первой константной области Ig и L234A_L235A_D265S_T350 V_L351Y_F405A_Y407 V во второй константной

области Ig.

158. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 157, где первая константная область Ig содержит SEQ ID NO: 110 или SEQ ID NO: 378.

159. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из пп. 157 или 158, где вторая константная область Ig имеет SEQ ID NO: 109 и SEQ ID NO: 158.

160. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по любому из пп. 135-157, где первая константная область Ig содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например*, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична SEQ ID NO: 378, а вторая константная область Ig содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например*, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична SEQ ID NO: 109.

161. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 160, где выделенный белок дополнительно содержит константную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична SEQ ID NO: 309.

162. Выделенное антитело к hK2/CD3, содержащее первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, где

a. первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 275, 258, 259 и 261, соответственно;

b. первый домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 136, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251; и/или

c. выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 351, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

163. Выделенное антитело к hK2/CD3, содержащее первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, где

a. первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

b. первый домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 136, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123; и/или

c. выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 351, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272.

164. Выделенное антитело к hK2/CD3, содержащее первый домен, который

связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, где

a. первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

b. первый домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 134, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251; и/или

c. выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 352, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

165. Выделенное антитело к hK2/CD3, содержащее первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, где

a. первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

b. первый домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 134, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123; и/или

c. выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 352, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272.

166. Выделенное антитело к hK2/CD3, содержащее первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, где

a. первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

b. первый домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 325, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 251; и/или

c. выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 353, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

167. Выделенное антитело к hK2/CD3, содержащее первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, где

a. первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2,

HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

b. первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331; и/или

c. выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 354, LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2 SEQ ID NO: 360.

168. Выделенное антитело к hK2/CD3, содержащее первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, где

a. первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

b. первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH, который по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VH SEQ ID NO: 162, и VL, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv, который по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичен scFv SEQ ID NO: 331; и/или

c. выделенный мультиспецифический белок содержит HC1, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична HC1 SEQ ID NO: 354, LC1, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична HC2 SEQ ID NO: 360.

169. Выделенный белок антитела к hK2/CD3 по п. 167 или 168, где выделенный мультиспецифический белок содержит лизин (например, K477) на C-конце HC1 и HC2, и при этом выделенный мультиспецифический белок содержит HC1, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична HC1 SEQ ID NO: 361, и HC2, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична HC2 SEQ ID NO: 362.

170. Выделенное антитело к hK2/CD3, содержащее первый домен, который

связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, где

a. первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186 и 187, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

b. первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 444, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331; и/или

c. выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 355, LC1 SEQ ID NO: 445 и HC2 SEQ ID NO: 360.

171. Выделенное антитело к hK2/CD3, содержащее первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, где

a. первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

b. первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165, и второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331; и/или

c. выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 356, LC1 SEQ ID NO: 222, и HC2 SEQ ID NO: 360.

172. Выделенное антитело к hK2/CD3, содержащее первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, где

a. первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

b. первый домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 325, а второй связывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123; и/или

c. выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 353, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272.

173. Выделенное антитело к hK2/CD3, содержащее первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, где

a. первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, 209, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2,

HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 116, 117, 118, 119, 120 и 121, соответственно;

b. первый домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 316, а второй связывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH SEQ ID NO: 122 и VL SEQ ID NO: 123; и/или

c. выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 357, HC2 SEQ ID NO: 359, и LC2 SEQ ID NO: 272.

174. Выделенное антитело к hK2/CD3, содержащее первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, где

a. первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470, 209, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259, и 261, соответственно;

b. первый домен, который связывает hK2, содержит scFv SEQ ID NO: 316, а второй связывающий домен, который связывается с лимфоцитарным антигеном, содержит VH SEQ ID NO: 248 и VL SEQ ID NO: 151; и/или

c. выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 357, HC2 SEQ ID NO: 358, и LC2 SEQ ID NO: 267.

175. Выделенное антитело к hK2/CD3, содержащее первый домен, который связывает hK2, и второй домен, который связывает CD3, где

a. первый домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174 и 175, соответственно, а второй домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 255, 256, 257, 258, 259 и 261, соответственно;

b. первый связывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163, а второй связывающий домен, который связывает лимфоцитарный антиген, содержит scFv SEQ ID NO: 331; и/или

c. выделенный мультиспецифический белок содержит HC1 SEQ ID NO: 361, LC1 SEQ ID NO: 221, и HC2 SEQ ID NO: 362.

176. Иммуноконъюгат, содержащий выделенный белок по любому из пп. 1-95, связанный с терапевтическим агентом или агентом визуализации.

177. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный белок по любому из пп. 1-95 и фармацевтически приемлемый носитель.

178. Полинуклеотид, кодирующий выделенный белок по любому из пп. 1-95.

179. Полинуклеотид

a. кодирующий выделенный белок по любому из пп. 1-95; и/или

b. содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246,

247, 263, 271, 274, 282, 292, 293, 294, 295, 303, 304, 305, 306, 312, 317, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 450 или 451.

180. Полинуклеотид

a. кодирующий выделенный белок, который по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичен выделенному белку по любому иодному з пп. 1-95; и/или

b. содержащий полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 263, 271, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 303, 304, 305, 306, 312, 316, 317, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 446, 450 или 451.

181. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 179 или 180.

182. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 181.

183. Способ получения выделенного белка по любому из пп. 1-95, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 182 в условиях, в которых белок экспрессируется, и выделение белка, продуцируемого клеткой-хозяином.

184. Иммуноконъюгат, содержащий выделенный биспецифический белок по любому из пп. 96-175, связанный с терапевтическим агентом или агентом визуализации.

185. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный биспецифияеский белок по любому из пп. 96-175 и фармацевтически приемлемый носитель.

186. Полинуклеотид

a. кодирующий биспецифический белок по любому из пп. 96-175; и/или

b. содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 263, 271, 274, 282, 292, 293, 294, 295, 303, 304, 305, 306, 312, 316, 317, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 450 или 451.

187. Полинуклеотид

a. кодирующий выделенный белок, который по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентичен выделенному белку по любому из пп. 96-175; и/или

b. содержащий полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 263, 271, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 303, 304, 305, 306, 312, 316, 317, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 446, 450 или 451.

188. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 186 или 187.

189. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 188.

190. Способ получения выделенного биспецифического белка по любому из пп. 96-175, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 189 в условиях, в которых мультиспецифический белок экспрессируется, и выделение мультиспецифического белка, продуцируемого клеткой-хозяином.

191. Способ лечения рака, экспрессирующего hK2, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного белка по любому из пп. 1-95, выделенного биспецифического белка по любому из пп. 96-175, иммуноконъюгата по п. 176 или 184 или фармацевтической композиции по п. 177 или 185 субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака, экспрессирующего hK2.

192. Способ уменьшения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2, включающий введение выделенного белка по любому из пп. 1-95, выделенного биспецифического белка по любому из пп. 96-175, иммуноконъюгата по п. 176 или 184 или фармацевтической композиции по п. 177 или 185 субъекту в течение времени, достаточного для уменьшения количества опухолевых клеток, экспрессирующих hK2.

193. Способ предотвращения образования рака, экспрессирующего hK2, включающий введение выделенного белка по любому из пп. 1-95, выделенного биспецифического белка по любому из пп. 95-175, иммуноконъюгата по п. 176 или 184 или фармацевтической композиции по п. 177 или 185 субъекту в течение времени, достаточного для предотвращения образования рака, экспрессирующего hK2.

194. Способ лечения неракового состояния у субъекта, подверженного риску развития рака, экспрессирующего hK2, включающий введение выделенного белка по любому из пп. 1-95, выделенного мультиспецифического белка по любому из пп. 96-175, иммуноконъюгата по п. 176 или 184 или фармацевтической композиции по п. 177 или 185 субъекту для лечения неракового состояния.

195. Способ по любому из пп. 191-194, в котором рак, экспрессирующий hK2, представляет собой рак предстательной железы или рак молочной железы.

196. Способ по п. 195, в котором рак предстательной железы представляет собой рецидивирующий, рефрактерный, злокачественный или устойчивый к кастрации рак предстательной железы или любую их комбинацию.

197. Способ по п. 195, где рак молочной железы представляет собой положительный по андрогенному рецептору (AR) рак молочной железы, рецидивирующий, рефрактерный или злокачественный рак молочной железы или любую их комбинацию.

198. Способ по п. 195, где нераковое состояние представляет собой увеличенную предстательную железу, доброкачественную гиперплазию предстательной железы (ДГПЖ) или состояние с высоким содержанием простатспецифического антигена (ПСА) при отсутствии диагностированного рака предстательной железы.

199. Способ по любому из пп. 191-198, в котором выделенный белок или

выделенный мультиспецифический белок вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

200. Способ по п. 199, в котором второй терапевтический агент представляет собой хирургическое вмешательство, химиотерапию, терапию по депривации андрогенов или облучение, или любую их комбинацию.

201. Способ обнаружения наличия рака предстательной железы или рака молочной железы у субъекта, включающий введение субъекту иммуноконъюгата по п. 176 или 184 субъекту, предположительно имеющему рак простаты или рак молочной железы, и визуализацию биологических структур, к которым связывается иммуноконъюгат, таким образом обнаруживая наличие рака предстательной железы или рака молочной железы.

202. Набор, содержащий выделенный белок по любому из пп. 1-95, выделенный биспецифический белок по любому из пп. 96-175, иммуноконъюгат по п. 176 или 184 или фармацевтическую композицию по п. 177 или 185.

203. Антиидиотипическое антитело, связывающееся с выделенным белком по любому из пп. 1-95.

204. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:

a. внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2;

b. трансмембранный домен; и

c. внутриклеточный сигнальный домен, необязательно содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

205. CAR по п. 204, дополнительно содержащий шарнирную область CD8a.

206. CAR по п. 204 или 205, где

a. трансмембранный домен включает полипептид CD8a трансмембранной области (CD8a-TM); и

b. внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий домен, содержащий компонент члена 9 суперсемейства TNF-рецепторов (CD137) и первичный сигнальный домен, содержащий компонент дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток.

207. CAR по п. 204 или 206, где

a. Шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25;

b. трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26; и/или

C. внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующий домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27, и первичный сигнальный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%

идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28.

208. CAR по любому из пп. 204-207, где антигенсвязывающий домен, который связывается с hK2, содержит HCDR1 SEQ ID NO: 63, 72, 141, 147, 170, 176, 188, 194, 196, 198, 200, 206 или 216, HCDR2 SEQ ID NO: 64, 65, 73, 142, 148, 171, 177, 183, 189, 195, 197, 199, 201, 207 или 217, HCDR3 SEQ ID NO: 66, 143, 172, 178, 184, 190, 208 или 218, LCDR1 SEQ ID NO: 67, 68, 144, 173, 179, 182, 185 или 191, LCDR2 SEQ ID NO: 69, 70, 145, 174, 180, 186, 192 или 470 и LCDR3 SEQ ID NO: 71, 146, 175, 181, 187, 193 или 209.

209. CAR по любому из пп. 204-208, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3

a. SEQ ID NO: 63, 64, 66, 67, 69 и 71, соответственно;

b. SEQ ID NO: 63, 65, 66, 67, 69 и 71, соответственно;

c. SEQ ID NO: 63, 65, 66, 68, 70 и 71, соответственно;

d. SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

e. SEQ ID NO: 170, 171, 172, 173, 174, и 175, соответственно;

f. SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180, и 181, соответственно;

g. SEQ ID NO: 170, 183, 184, 185, 186, и 187, соответственно;

h. SEQ ID NO: 188, 189, 190, 191, 192 и 193, соответственно;

i. SEQ ID NO: 206, 207, 208, 182, 470 или 209, соответственно;

j. SEQ ID NO: 72, 73, 66, 67, 69 и 71, соответственно;

k. SEQ ID NO: 72, 73, 66, 68, 70 и 71, соответственно.

l. SEQ ID NO: 147, 148, 143, 144, 145 и 146, соответственно;

m. SEQ ID NO: 194, 195, 172, 173, 174 и 175, соответственно;

n. SEQ ID NO: 196, 197, 178, 179, 180 и 181, соответственно;

o. SEQ ID NO: 198, 199, 184, 185, 186 и 187, соответственно;

p. SEQ ID NO: 200, 201, 190, 191, 192 и 193, соответственно; или

q. SEQ ID NO: 216, 217, 218, 182, 470 и 209, соответственно.

210. CAR по любому из пп. 204-209, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 163 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 162

211. CAR по любому из пп. 204-209, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 138 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 137; или LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL SEQ ID NO: 140 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH SEQ ID NO: 139.

212. CAR по любому из пп. 204-211, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит

a. VH с SEQ ID NO: 137 и VL SEQ ID NO: 138;

b. VH с SEQ ID NO: 162 и VL SEQ ID NO: 163;

c. VH с SEQ ID NO: 164 и VL SEQ ID NO: 165;

d. VH с SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 167;

e. VH с SEQ ID NO: 168 и VL SEQ ID NO: 169;

f. VH с SEQ ID NO: 204 и VL SEQ ID NO: 205; или

g. VH с SEQ ID NO: 166 и VL SEQ ID NO: 444.

213. CAR по любому из пп. 204-212, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 75 и VL SEQ ID NO: 74.

214. CAR по любому из пп. 204-211, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, включает VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 138 или SEQ ID NO: 140 и VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 137 или SEQ ID NO: 139.

215. CAR по п. 213, где антигенсвязываюий домен, который связывает hK2, содержит VH SEQ ID NO: 1, 2, 3, 140 или 160 и/или VL SEQ ID NO: 4, 5, 6, 139, 159, или 161.

216. CAR по п. 215, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит

a. VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 1;

b. VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 2;

c. VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 3;

d. VH SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 140;

e. VH с SEQ ID NO: 4 и VL SEQ ID NO: 160;

f. VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 1;

g. VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 3;

h. VH SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 140;

i. VH с SEQ ID NO: 5 и VL SEQ ID NO: 160;

j. VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 1;

k. VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 2;

l. VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 3;

m. VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 140;

n. VH SEQ ID NO: 6 и VL SEQ ID NO: 160;

o. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 1;

p. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 2;

q. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 3;

r. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 140;

s. VH SEQ ID NO: 139 и VL SEQ ID NO: 160;

t. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 1;

u. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 2;

v. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 3;

w. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 140;

x. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 160;

y. VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 1;

z. VH SEQ ID NO: 159 и VL SEQ ID NO: 2;

aa. VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 3;

bb. VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 140; или

cc. VH SEQ ID NO: 161 и VL SEQ ID NO: 160.

217. CAR по любому из пп. 204-216, где антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, представляет собой scFv.

218. CAR по п. 217, где scFv содержит первый линкер (L1) между VL и VH.

219. CAR по п. 218, где L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

220. CAR по п. 219, где scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 133, 134, 135, 136, 308, 316, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 404, 405, 406, 407, 408 или 409.

221. CAR по п. 219, где scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 404 или SEQ ID NO: 405.

222. CAR по п. 219, где scFv содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135 или SEQ ID NO: 136

223. CAR по любому из пп. 217-222, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, дополнительно содержит сигнальный полипептид.

224. CAR по п. 223, где сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

225. CAR по любому из пп. 204-224, где внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента члена 9 суперсемейства рецепторов ФНО (CD137), компонента дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток, компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента члена суперсемейства дифференцировки и их комбинации.

226. CAR по любому из пп. 204-225, где компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

227. CAR по пп. 204-226, в котором компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

228. CAR по любому из пп. 204-227, где внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

229. CAR по любому из пп. 204-228, где полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

230. CAR по любому из пп. 204-229, где шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

231. CAR по любому из пп. 223-230, где внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 149, 150, 151, 152, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424 или 425.

232. CAR по любому из пп. 223-230, где внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 416 или SEQ ID NO: 417.

233. CAR по любому из пп. 223-230, где внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hK2, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151 или SEQ ID NO: 152.

234. CAR по любому из пп. 204-233, где CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 153, 154, 155, 156, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 435, 436, 437, 438, 439, 440 или 441.

235. CAR по любому из пп. 204-233, где CAR содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 432 или SEQ ID NO: 433.

236. CAR по любому из пп. 204-233, где CAR содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% (*например,* по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155 или SEQ ID NO: 156.

237. Выделенный лимфоцит, экспрессирующий CAR по любому из пп. 204-236.

238. Выделенный лимфоцит по п. 237, где лимфоцит представляет собой Т-лимфоцит.

239. Выделенный лимфоцит по п. 238, где Т-лимфоцит представляет собой натуральную клетку-киллер (NK).

240. Выделенный полинуклеотид, кодирующий CAR по любому из пп. 204-236.

241. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 240.

242. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 240 или вектор по п. 241.

243. Фармацевтическая композиция, содержащая радиоактивный иммуноконъюгат по любому из пп. 237-239 и фармацевтически приемлемый носитель.

244. Способ лечения субъекта, имеющего рак, экспрессирующий hK2, включающий в себя: введение терапевтически эффективного количества лимфоцита по любому из пп. 237-239 субъекту, нуждающемуся в этом, при этом лимфоцит опосредует уничтожение рака, экспрессирующего hK2, у субъекта.

245. Способ по п. 244, где рак, экспрессирующий hK2, представляет собой рак предстательной железы или рак молочной железы.

246. Способ по п. 245, где рак, экспрессирующий hK2, представляет собой рак предстательной железы.

247. Способ направленного уничтожения раковой клетки, включающий приведение раковой клетки в контакт с лимфоцитом по одному из пунктов 244-246, где лимфоцит индуцирует уничтожение раковой клетки.

248. Способ по п. 247, где раковая клетка представляет собой клетку рака предстательной железы или клетку рака молочной железы.

249. Способ по п. 248, в котором раковая клетка представляет собой клетку рака предстательной железы.

250. Способ обнаружения наличия рака у субъекта, включающий:

(a) приведение образца клеток, полученного от субъекта, в контакт с CAR по п. 204-236, тем самым формируя комплекс CAR-клетка, и

(b) обнаружение комплекса, где обнаружение комплекса указывает на наличие рака у субъекта.

По доверенности

```
          1                                                  45
mu11B6_VH  DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWNWIRQFPGNR
hu11B6_VH  QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKG
KL2B357_VH QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKG
KL2B358_VH QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKG
KL2B359_VH QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKR
KL2B360_VH QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKG
      HCF3 QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKG
      HCG5 QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKG
       Aln :***************::*****:*:*************** **:

          46                                                 90
mu11B6_VH  LEWMGYISYSGSTTYSPSLKSRFSITRDTSKNQFFLQLNSVTPED
hu11B6_VH  LEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVD
KL2B357_VH LEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAAD
KL2B358_VH LEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAAD
KL2B359_VH LEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAAD
KL2B360_VH LEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAAD
      HCF3 LEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVD
      HCG5 LEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVD
       Aln ***:***********.******.:::******** *:*.***. *

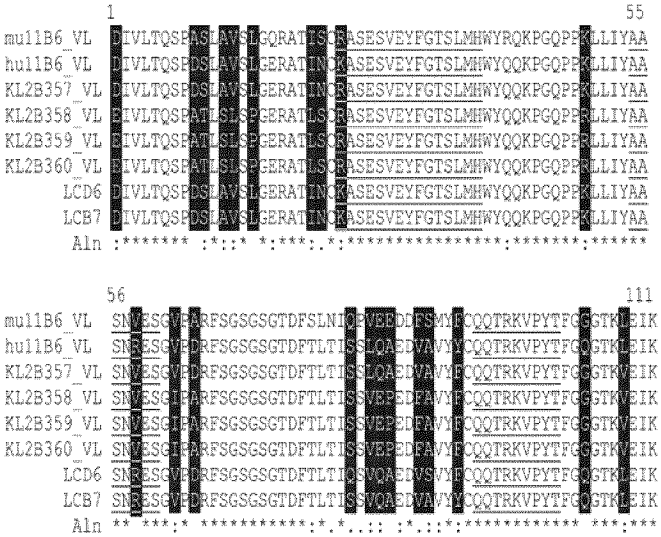
          91                        117
mu11B6_VH  TATYFCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
hu11B6_VH  TAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
KL2B357_VH TAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
KL2B358_VH TAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
KL2B359_VH TAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
KL2B360_VH TAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
      HCF3 TAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
      HCG5 TAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
       Aln **.*:**********************

Консенсусная последовательность VH (SEQ ID NO: 75)
QVQLQESGPGLVKPSX1TLSLTCX2VSGNSITSDYAWNWIRQX3PGKX4LEWX5GYISYSGSTT
YNPSLKSRVTX6SRDTSKNQFSLKLSSVTX7X8DTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS
```

X_1 представляет собой D или Q; X_5 представляет собой I или M;
X_2 представляет собой A или T; X_6 представляет собой I или M;
X_3 представляет собой P или F; X_7 представляет собой A или P; или
X_4 представляет собой G или R; X_8 представляет собой V или A.

Фиг. 1

Фиг. 2

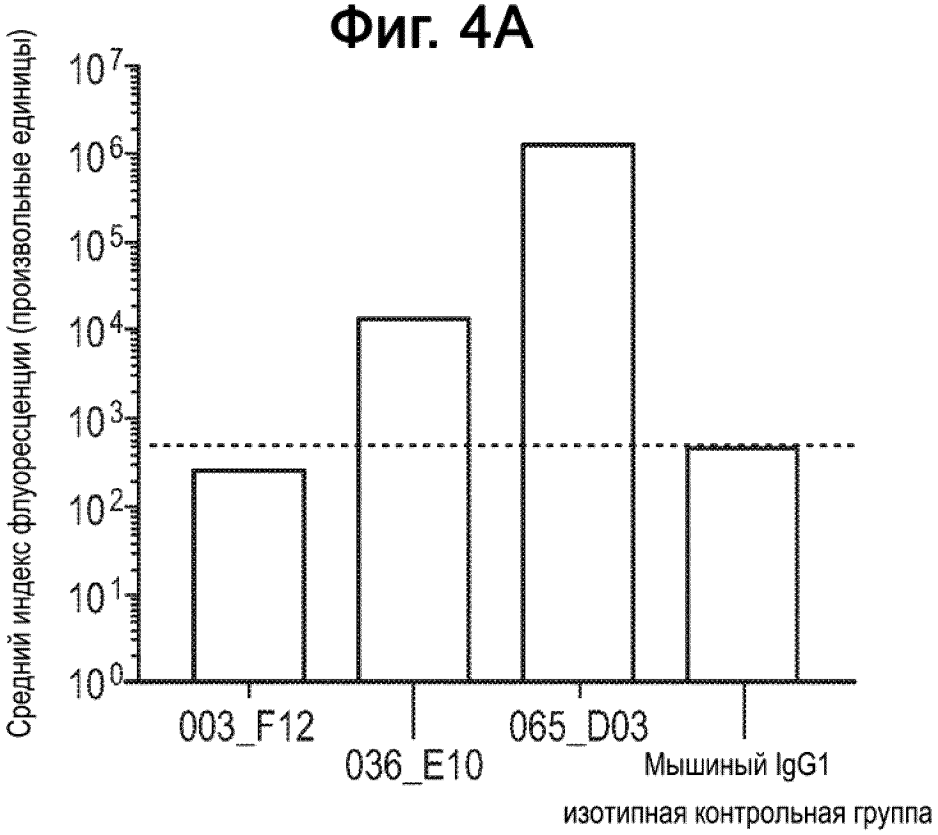


X_1 представляет собой D или E; X_2 представляет собой D или A; X_3 представляет собой S или T; X_4 представляет собой A или S; X_5 представляет собой V или L; X_6 представляет собой L или P; X_7 представляет собой I или L; X_8 представляет собой N или S; X_9 представляет собой R или K; X_{10} представляет собой K или R; X_{11} представляет собой V или R; X_{12} представляет собой V или I; X_{13} представляет собой A или D; X_{14} представляет собой Q или S; X_{15} представляет собой L или V; X_{16} представляет собой Q или E; X_{17} представляет собой P или A; X_{18} представляет собой F или V; X_{19} представляет собой A или S; X_{20} представляет собой Y или F; X_{21} представляет собой Q или G; и X_{22} представляет собой L или V.

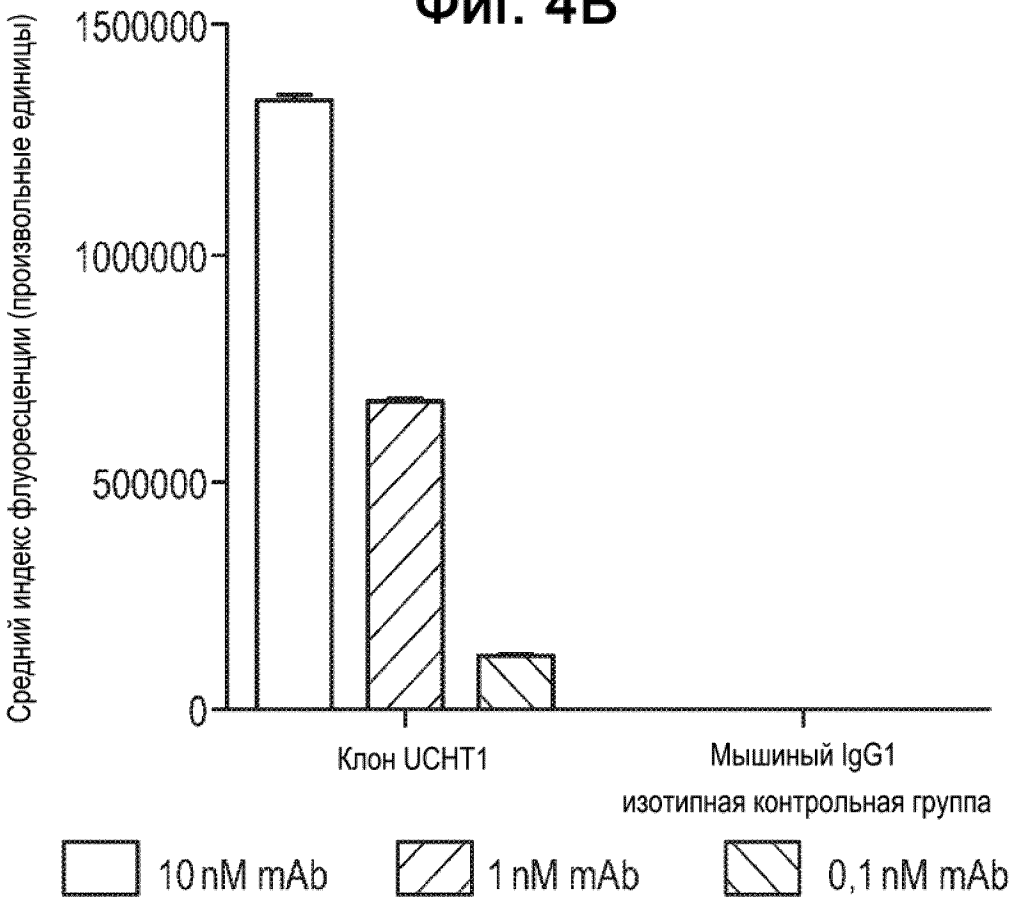
Фиг. 3


1 50
h11B6 VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL
KL2B494 VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL
KL2B467 VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL
KL2B30 VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL
KL2B413 VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL
KL2B53 VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL
51 100
h11B6 KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS
KL2B494 KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS
KL2B467 KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS
KL2B30 KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS
KL2B413 KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS
KL2B53 KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS
101 150
h11B6 SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLR
KL2B494 SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLR
KL2B467 SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLR
KL2B30 SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLR
KL2B413 SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLR
KL2B53 SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLR
151 200
h11B6 PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPL
KL2B494 PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPL
KL2B467 PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPL
KL2B30 PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPL
KL2B413 PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPL
KL2B53 PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPL
201 244
H11B6 VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP
KL2B494 VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP
KL2B467 VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP
KL2B30 VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP
KL2B413 VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP
KL2B53 VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP

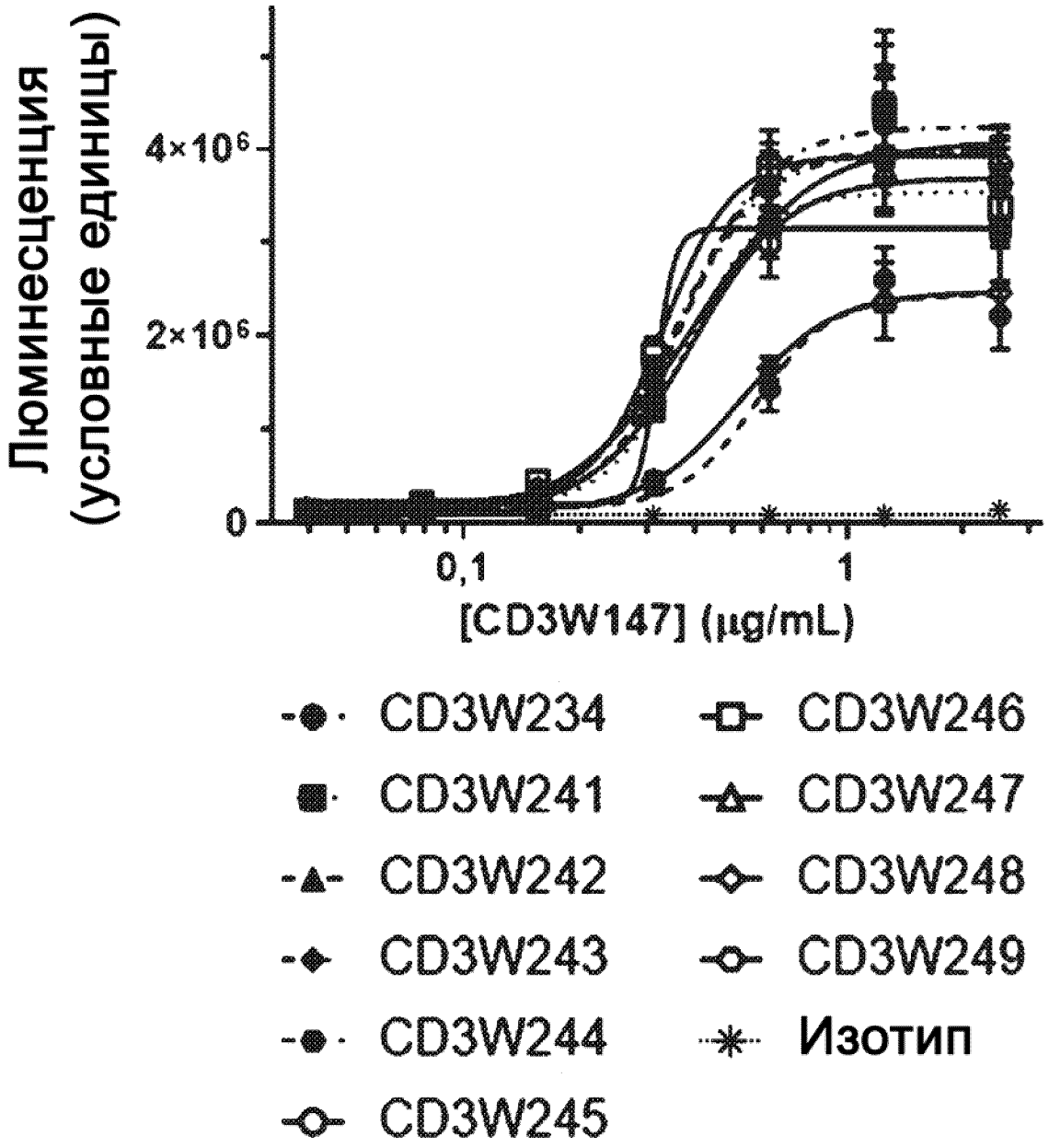
Фиг. 4A


Средний индекс флуоресценции (произвольные единицы)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
003_F12
036_E10
065_D03
Мышиный IgG1
изотипная контрольная группа

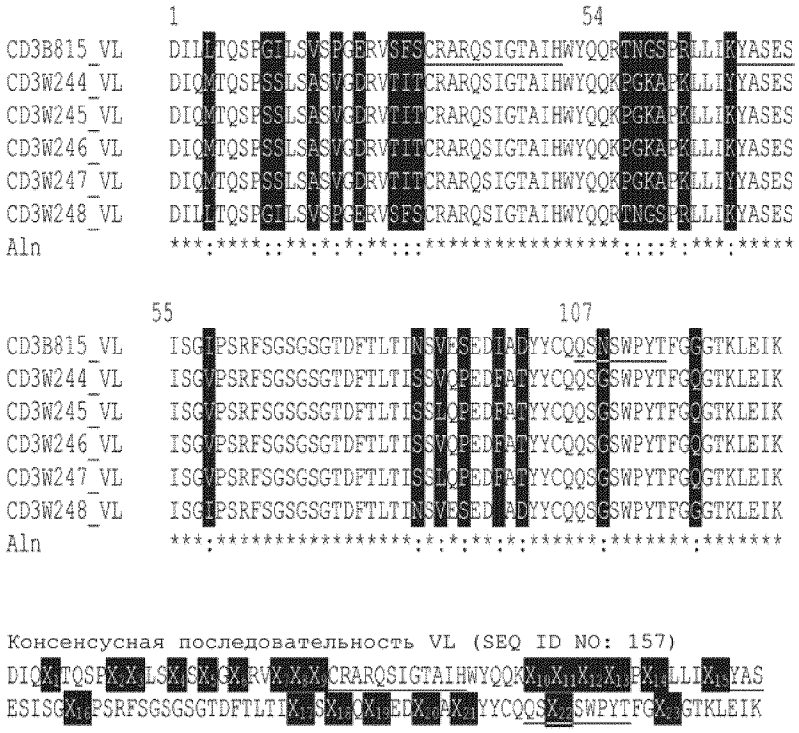
Фиг. 4B


Средний индекс флуоресценции (произвольные единицы)
1500000
1000000
500000
0
Клон UCHT1
Мышиный IgG1
изотипная контрольная группа
10 nM mAb
1 nM mAb
0,1 nM mAb

Фиг. 5


Люминесценция
(условные единицы)
4×10⁶
2×10⁶
0
0,1
1
[CD3W147] (μg/mL)
CD3W234
CD3W241
CD3W242
CD3W243
CD3W244
CD3W245
CD3W246
CD3W247
CD3W248
CD3W249
Изотип

Фиг. 6



Консенсусная последовательность VL (SEQ ID NO: 157)

DIQX_1TQSP$X_2$$X_3LSX_4SVX_5ERVX_6$$X_7$CRARQSIGTAIHWYQQ$X_8PX_9$$X_{10}$$X_{11}$$X_{12}$$X_{13}PX_{14}LLIX_{15}$YAS

ESISGX_{16}PSRFSGSGSGTDFTLT$X_{17}$$X_{18}SX_{19}$$X_{20}EDX_{21}AX_{22}$YYCQQS$X_{23}$SWPYTFG$X_{24}$GTKLEIK

где

X_1 представляет собой L или M; X_2 представляет собой G или S; X_3 представляет собой I или S;

X_4 представляет собой V или A; X_5 представляет собой P или V; X_6 представляет собой E или D;

X_7 представляет собой S или T; X_8 представляет собой F или I; X_9 представляет собой S или I;

X_{10} представляет собой T или P; X_{11} представляет собой N или G; X_{12} представляет собой G или K;

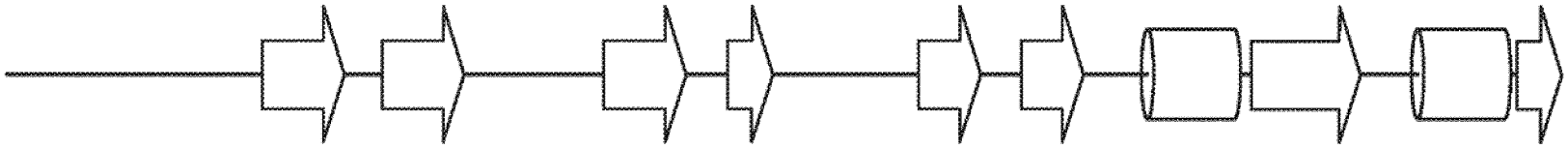
X_{13} представляет собой S или A; X_{14} представляет собой R или K; X_{15} представляет собой K или Y;

X_{16} представляет собой I или V; X_{17} представляет собой N или S; X_{18} представляет собой V или L;

X_{19} представляет собой S или P; X_{20} представляет собой I или F; X_{21} представляет собой D или T;

X_{22} представляет собой N или G; или X_{23} представляет собой G или Q.

Фиг. 7



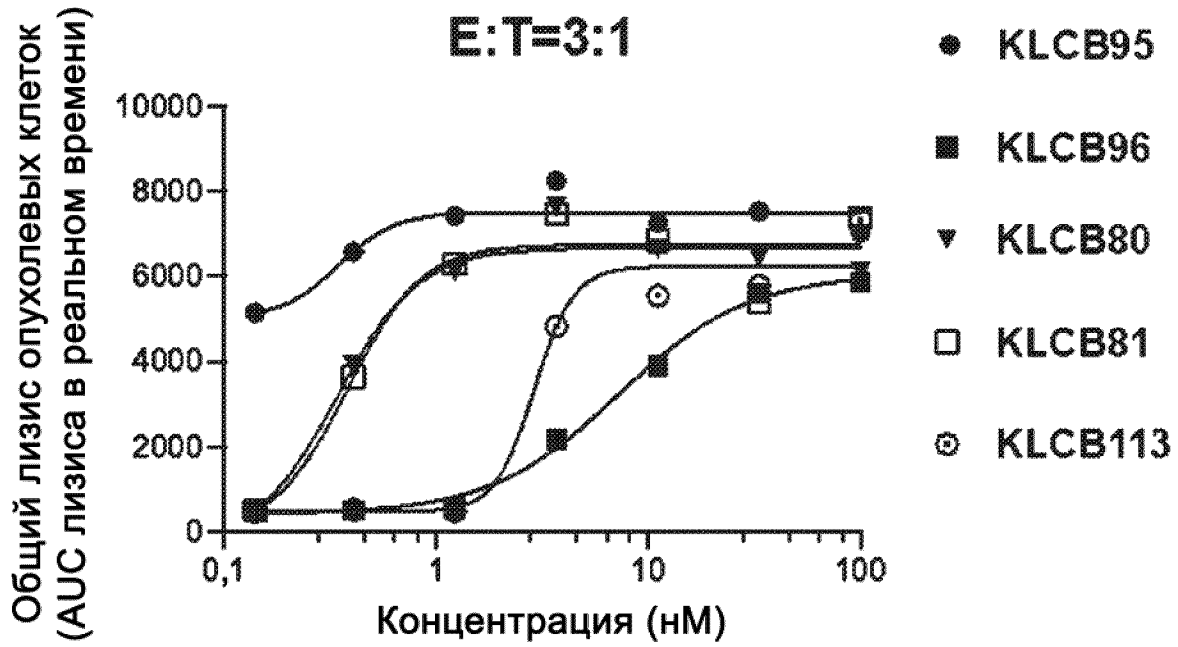
10 20 30 40 50 60 70 80 90

QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYL CD3ε

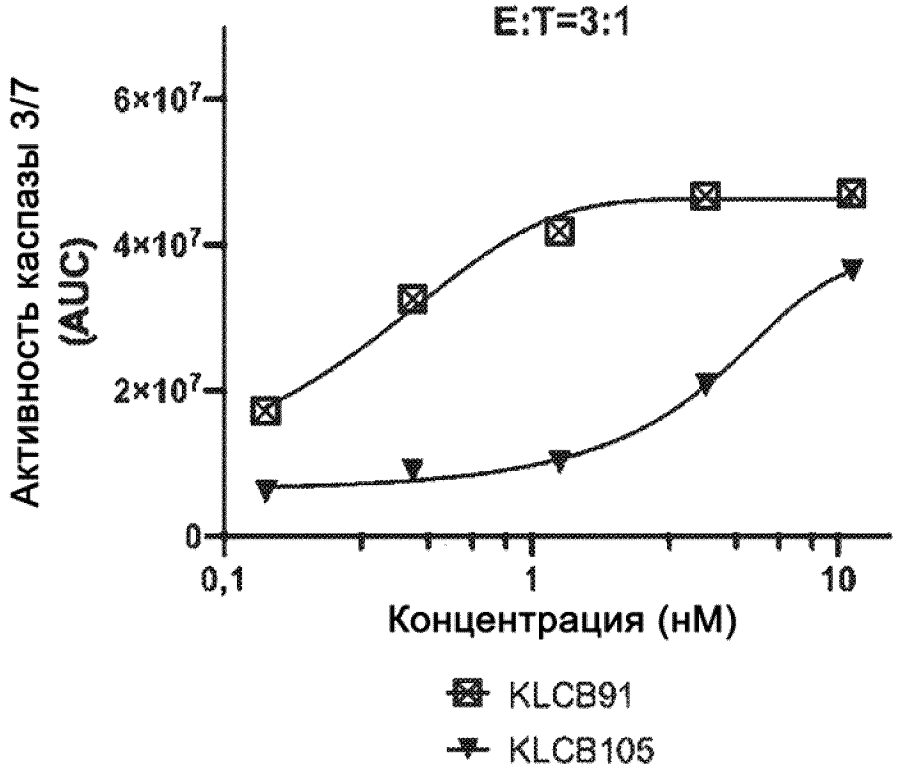
QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYL CD3ε : OKT3

QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYL CD3ε : CD3W245

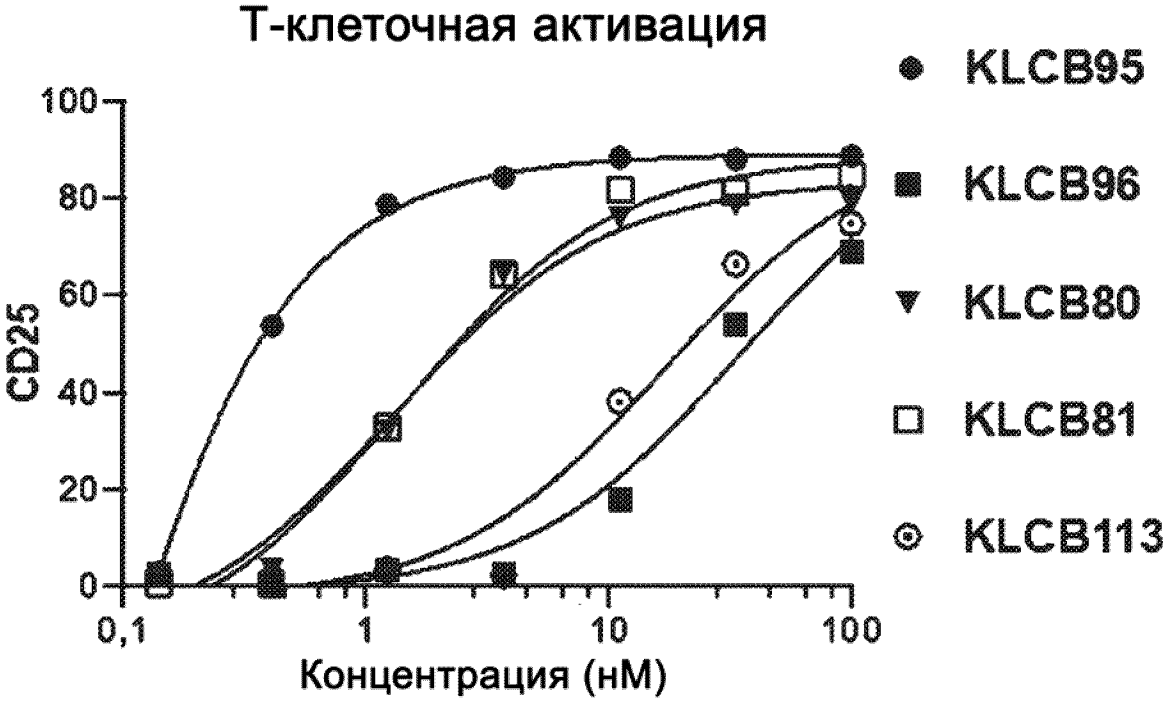
Фиг. 8A


E:T=3:1
Общий лизис опухолевых клеток (AUC лизиса в реальном времени)
10000
8000
6000
4000
2000
0
0,1
1
10
100
Концентрация (нМ)
KLCB95
KLCB96
KLCB80
KLCB81
KLCB113

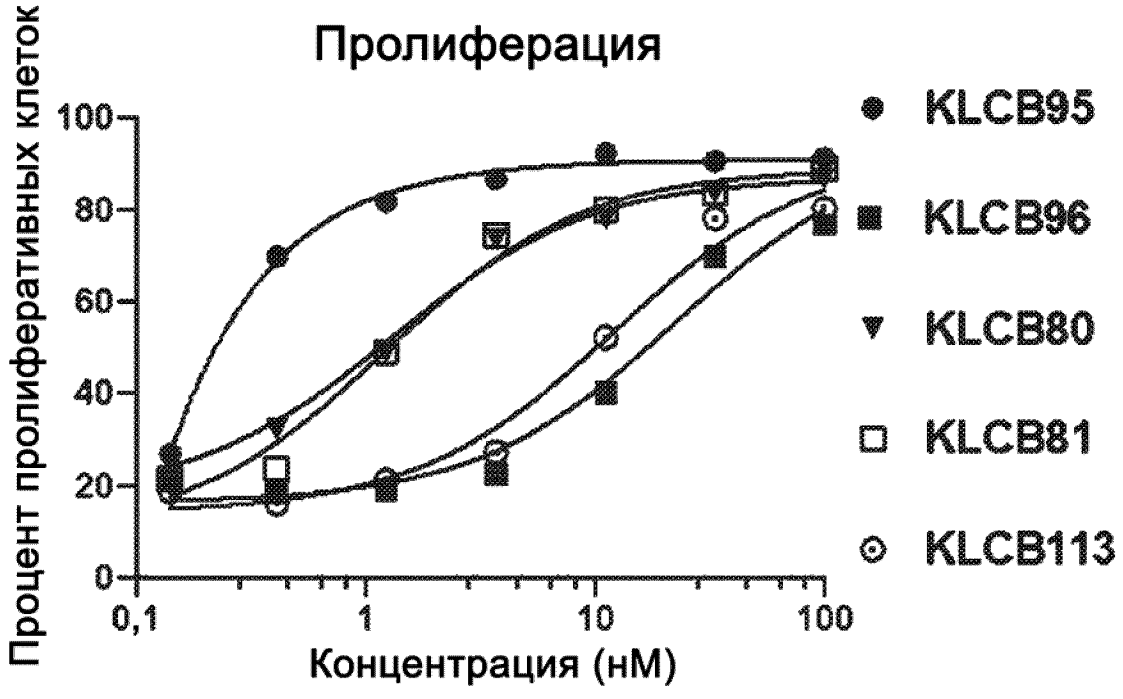
Фиг. 8B


E:T=3:1
Активность каспазы 3/7 (AUC)
6×10^7
4×10^7
2×10^7
0
0,1
1
10
Концентрация (нМ)
KLCB91
KLCB105

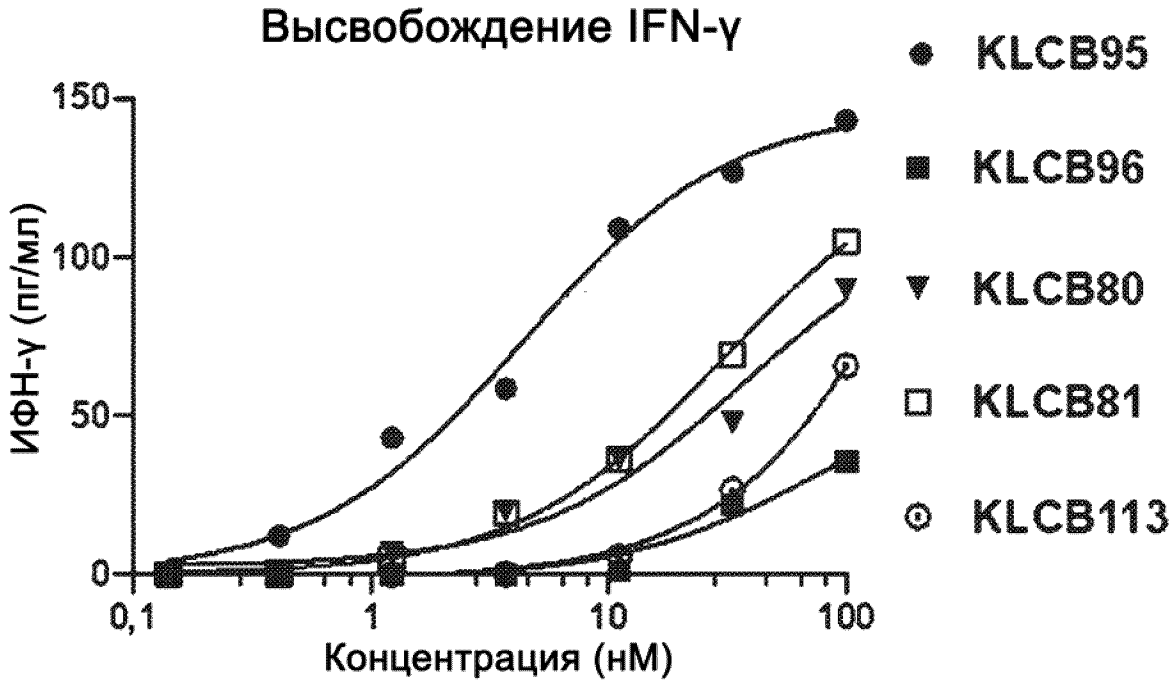
Фиг. 9A


Т-клеточная активация
CD25
100
80
60
40
20
0
0,1
1
10
100
Концентрация (нМ)
KLCB95
KLCB96
KLCB80
KLCB81
KLCB113

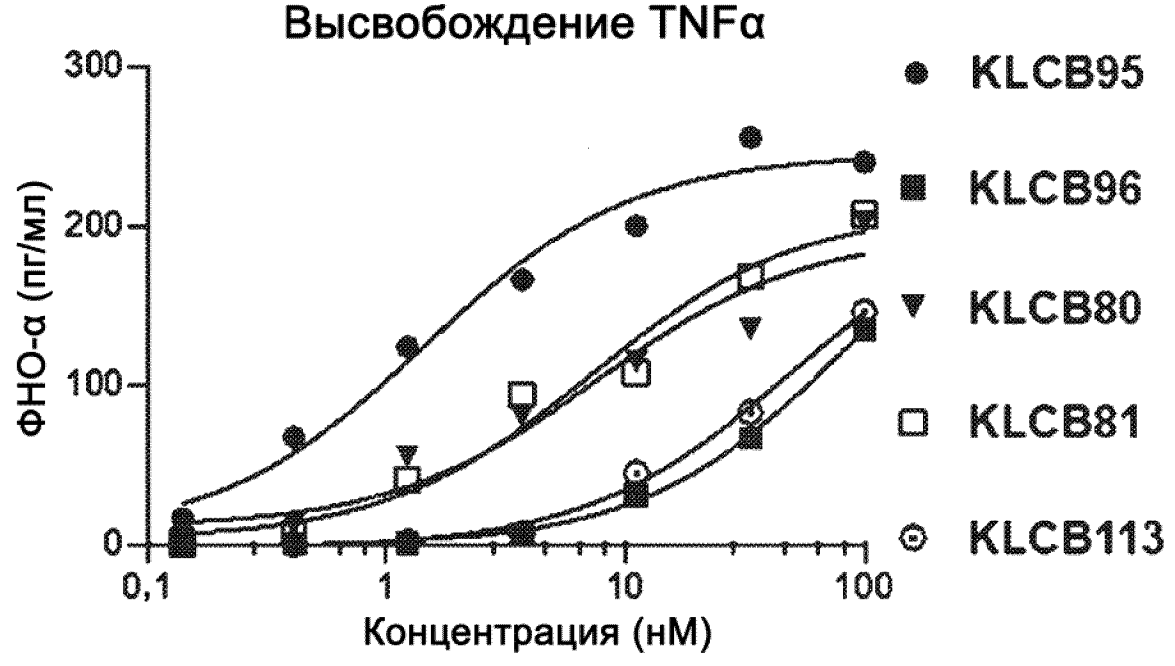
Фиг. 9B


Пролиферация
Процент пролиферативных клеток
100
80
60
40
20
0
0,1
1
10
100
Концентрация (нМ)
KLCB95
KLCB96
KLCB80
KLCB81
KLCB113

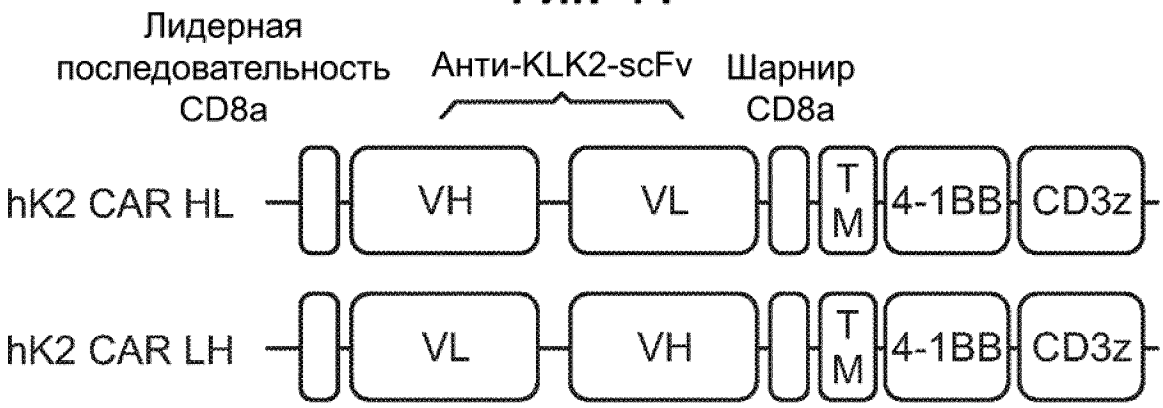
Фиг. 10A



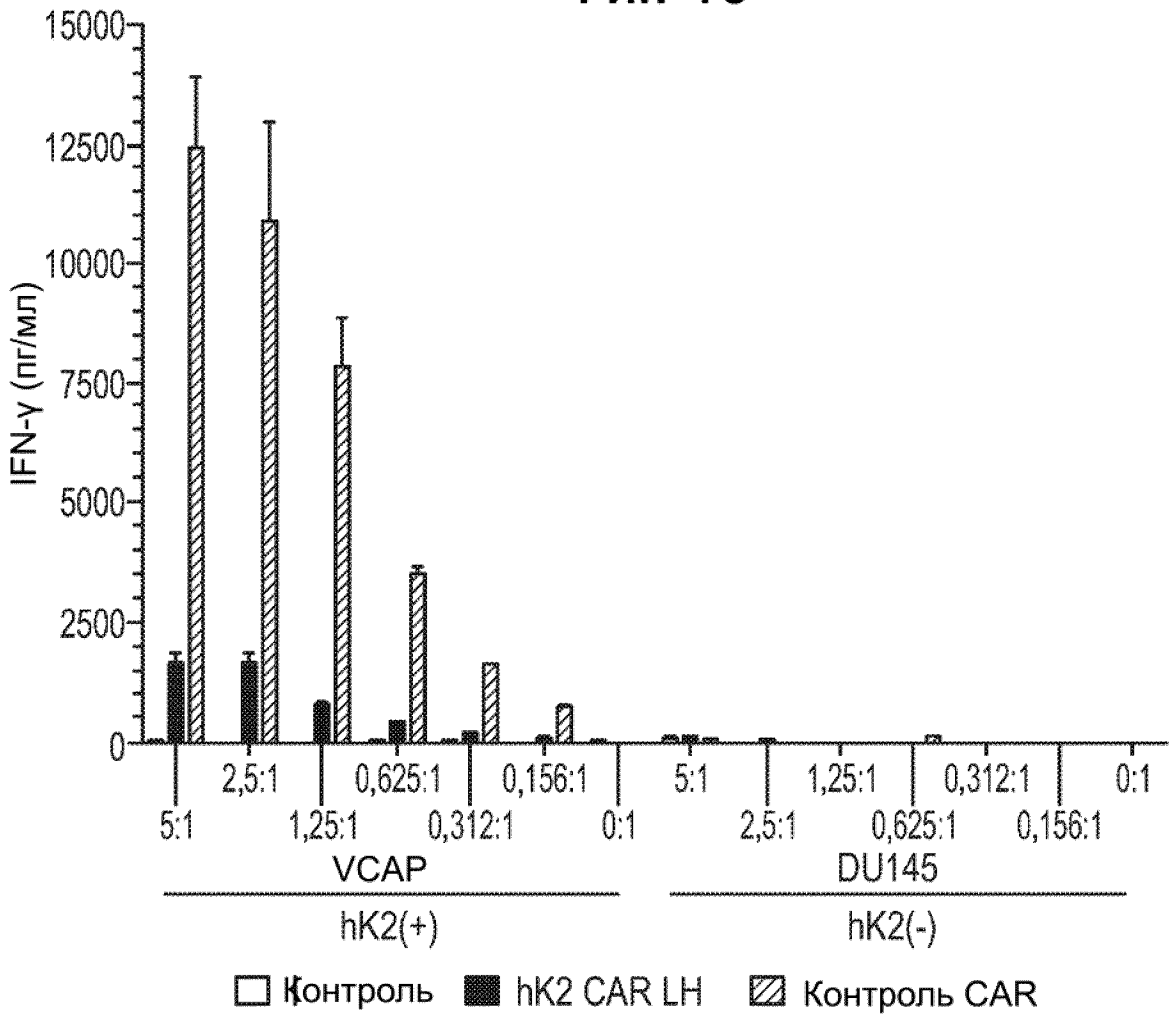
Фиг. 10B



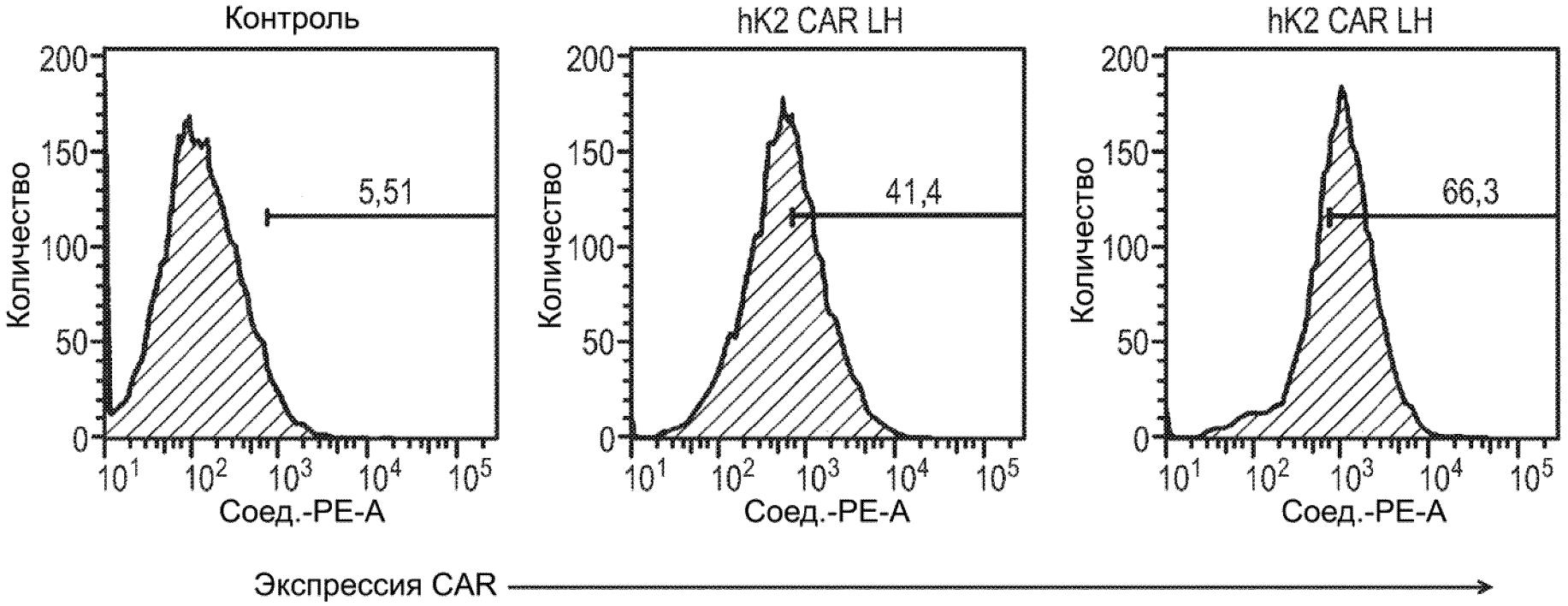
Фиг. 11


Лидерная последовательность CD8a
Анти-KLK2-scFv
Шарнир CD8a
hK2 CAR HL
VH
VL
TM
4-1BB
CD3z
hK2 CAR LH
VL
VH
TM
4-1BB
CD3z

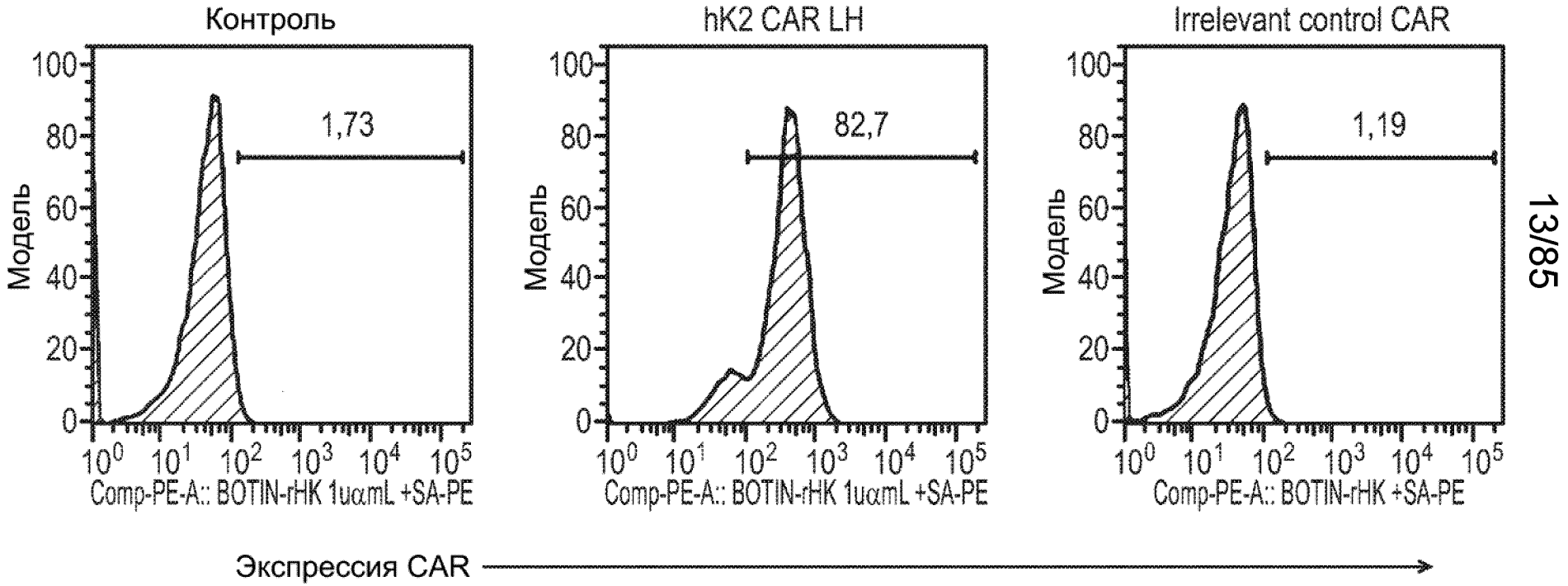
Фиг. 16

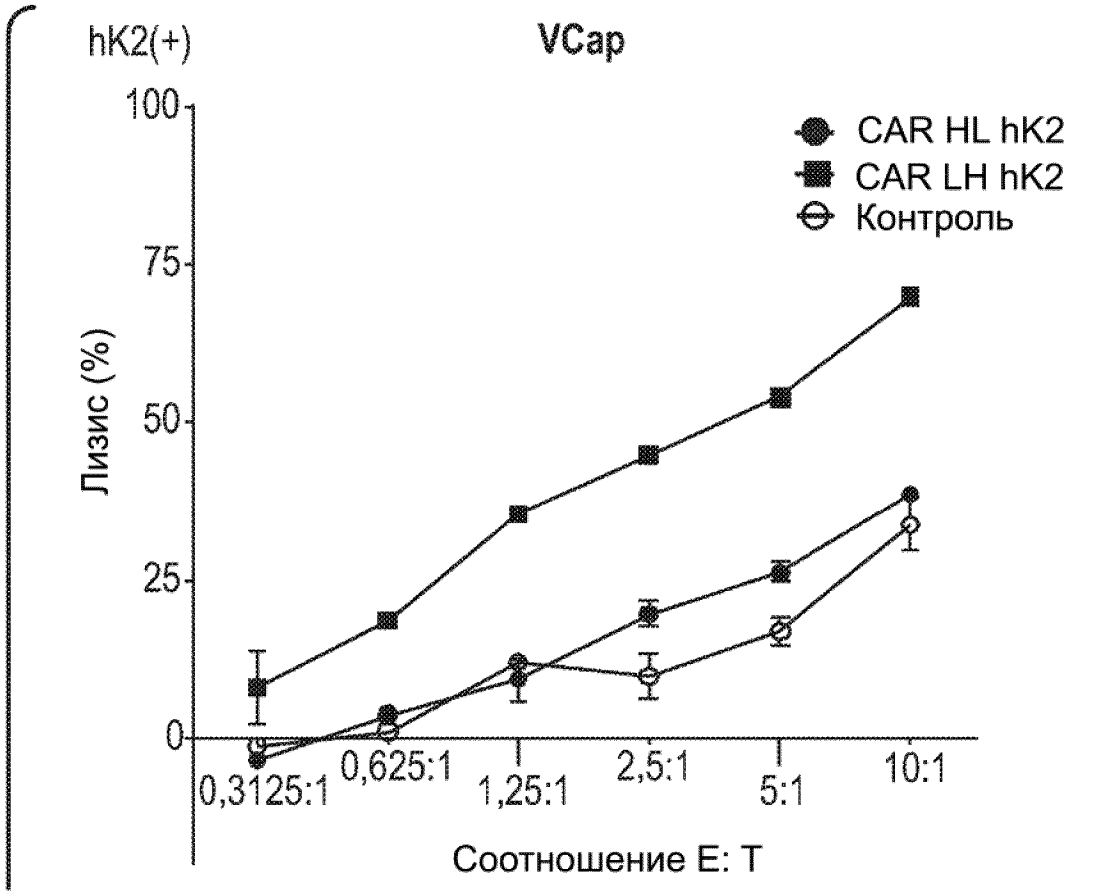

IFN-γ (пг/мл)
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
5:1
2,5:1
1,25:1
0,625:1
0,312:1
0,156:1
0:1
VCAP
hK2(+)
DU145
hK2(-)
Контроль
hK2 CAR LH
Контроль CAR

Фиг. 12A

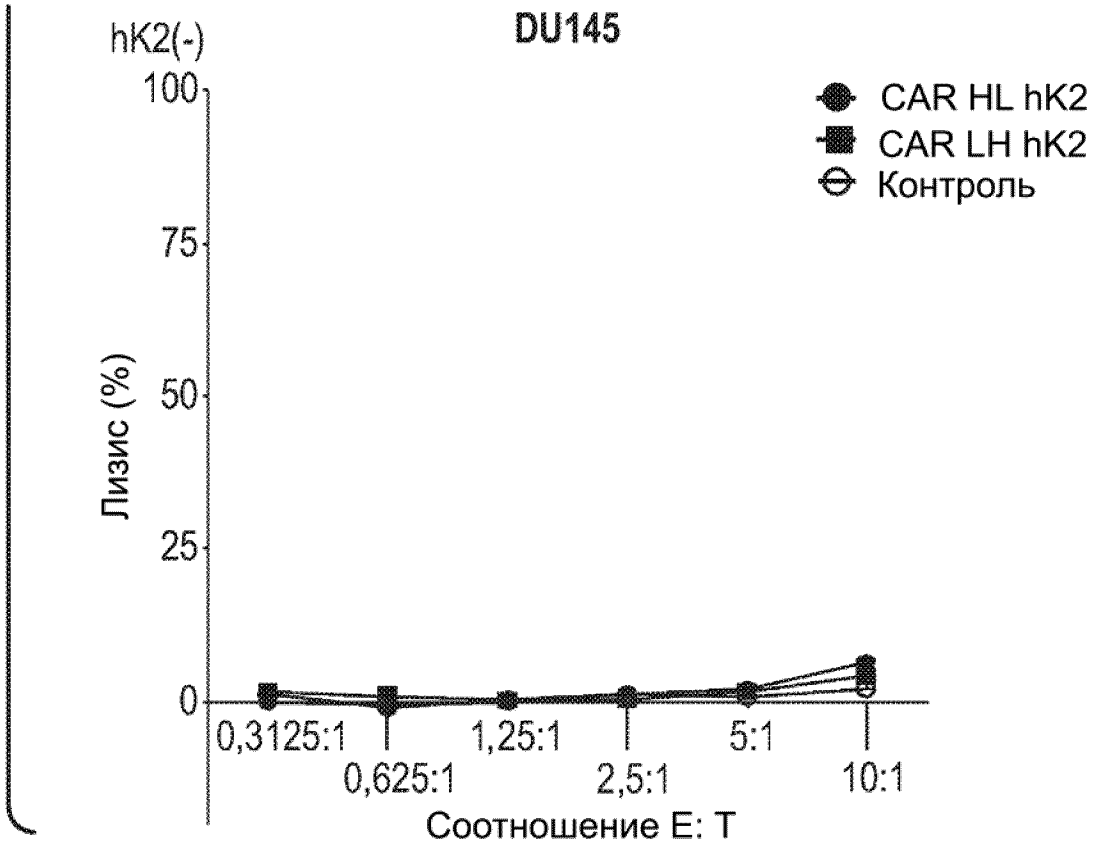

Контроль
hK2 CAR LH
hK2 CAR LH
Количество
200
150
100
50
0
5,51
41,4
66,3
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5
Соед.-PE-A
Экспрессия CAR

Фиг. 12B

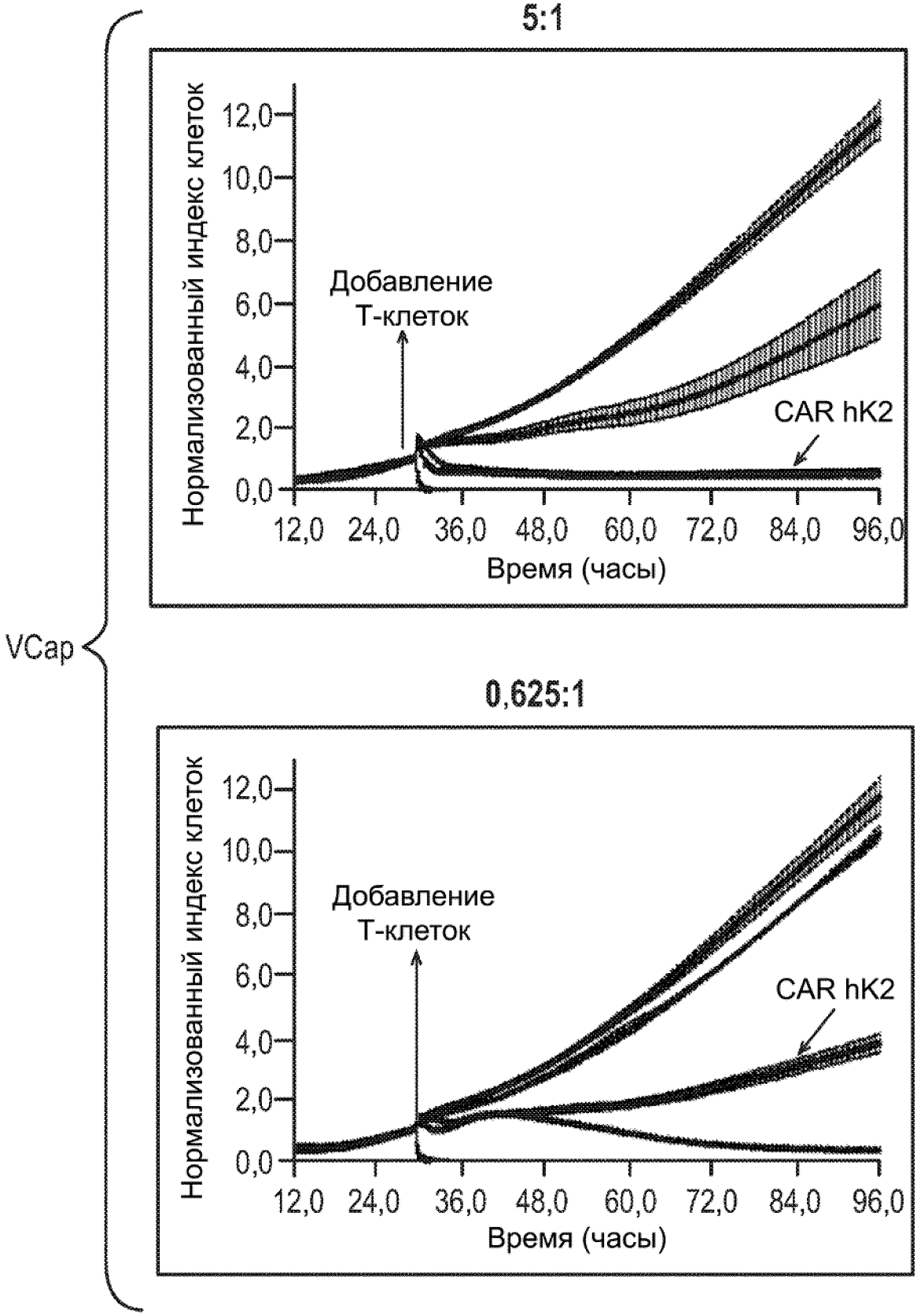

Контроль
hK2 CAR LH
Irrelevant control CAR
Модель
100
80
60
40
20
0
1,73
82,7
1,19
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5
Comp-PE-A:: BOTIN-rHK 1uαmL +SA-PE
Comp-PE-A:: BOTIN-rHK +SA-PE
Экспрессия CAR


hK2(+)
VCap
100
75
50
25
0
Лизис (%)
CAR HL hK2
CAR LH hK2
Контроль
0,3125:1
0,625:1
1,25:1
2,5:1
5:1
10:1
Соотношение E: T

Фиг. 13


hK2(-)
DU145
100
75
50
25
0
Лизис (%)
CAR HL hK2
CAR LH hK2
Контроль
0,3125:1
0,625:1
1,25:1
2,5:1
5:1
10:1
Соотношение E: T

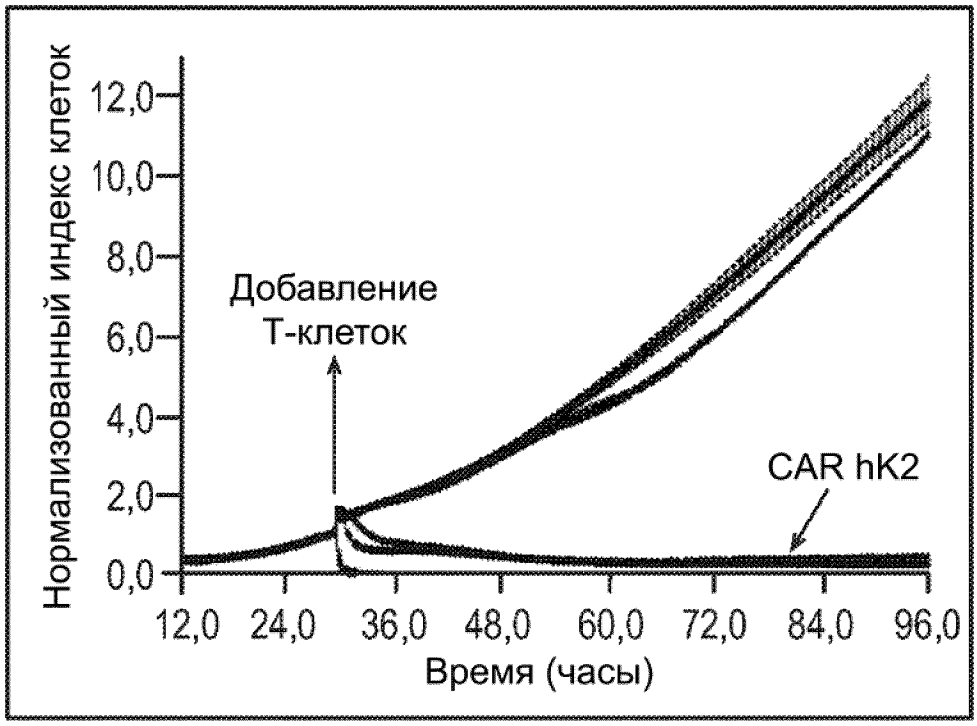
Фиг. 14


5:1
Нормализованный индекс клеток
12,0
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
Добавление
Т-клеток
CAR hK2
12,0 24,0 36,0 48,0 60,0 72,0 84,0 96,0
Время (часы)
VCap
0,625:1
Нормализованный индекс клеток
12,0
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
Добавление
Т-клеток
CAR hK2
12,0 24,0 36,0 48,0 60,0 72,0 84,0 96,0
Время (часы)

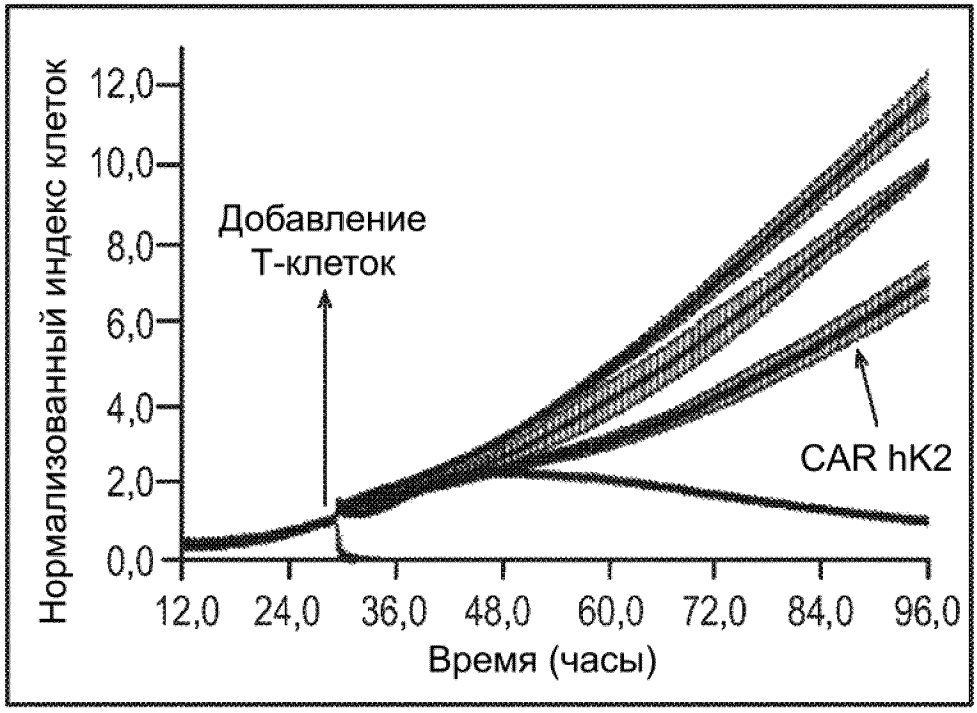
Фиг. 14 (продолж.)

VCap

25:1



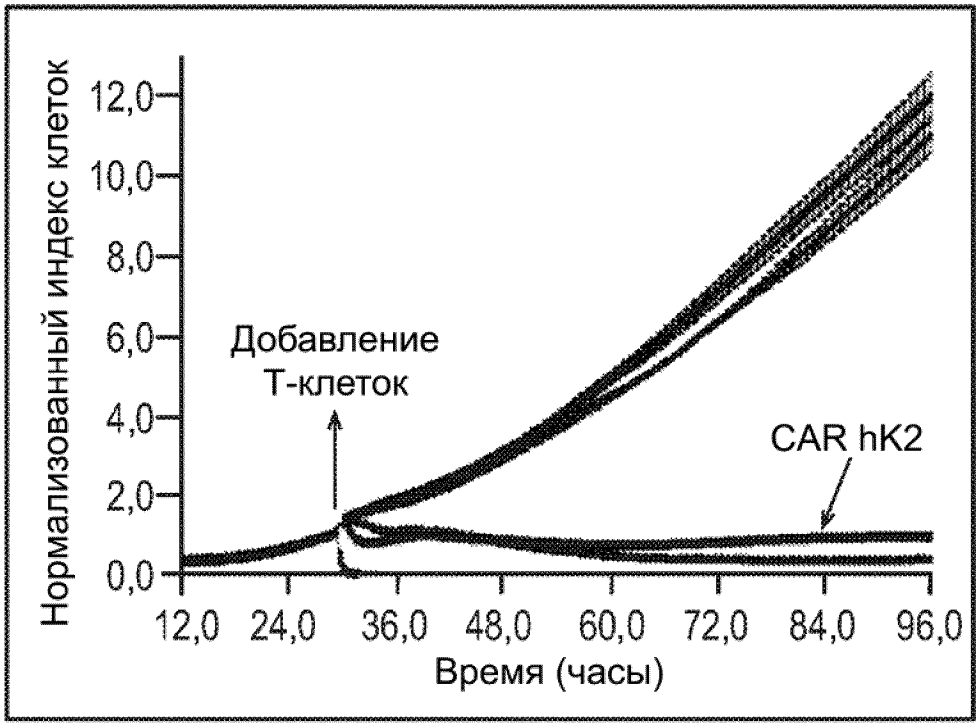
0,312:1



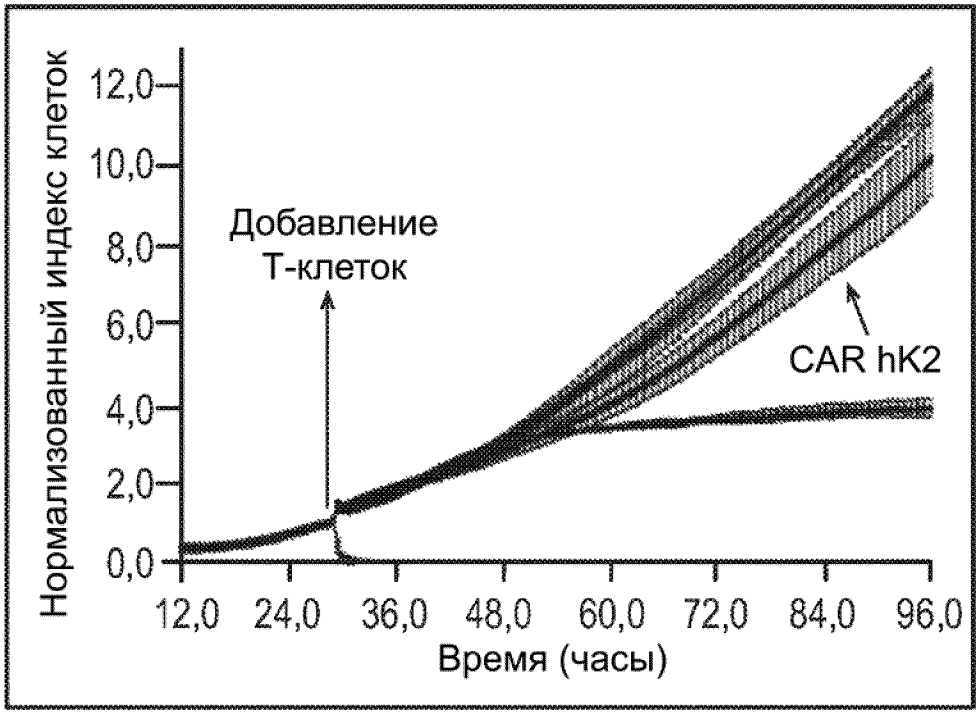
Фиг. 14 (продолж.)

VCap

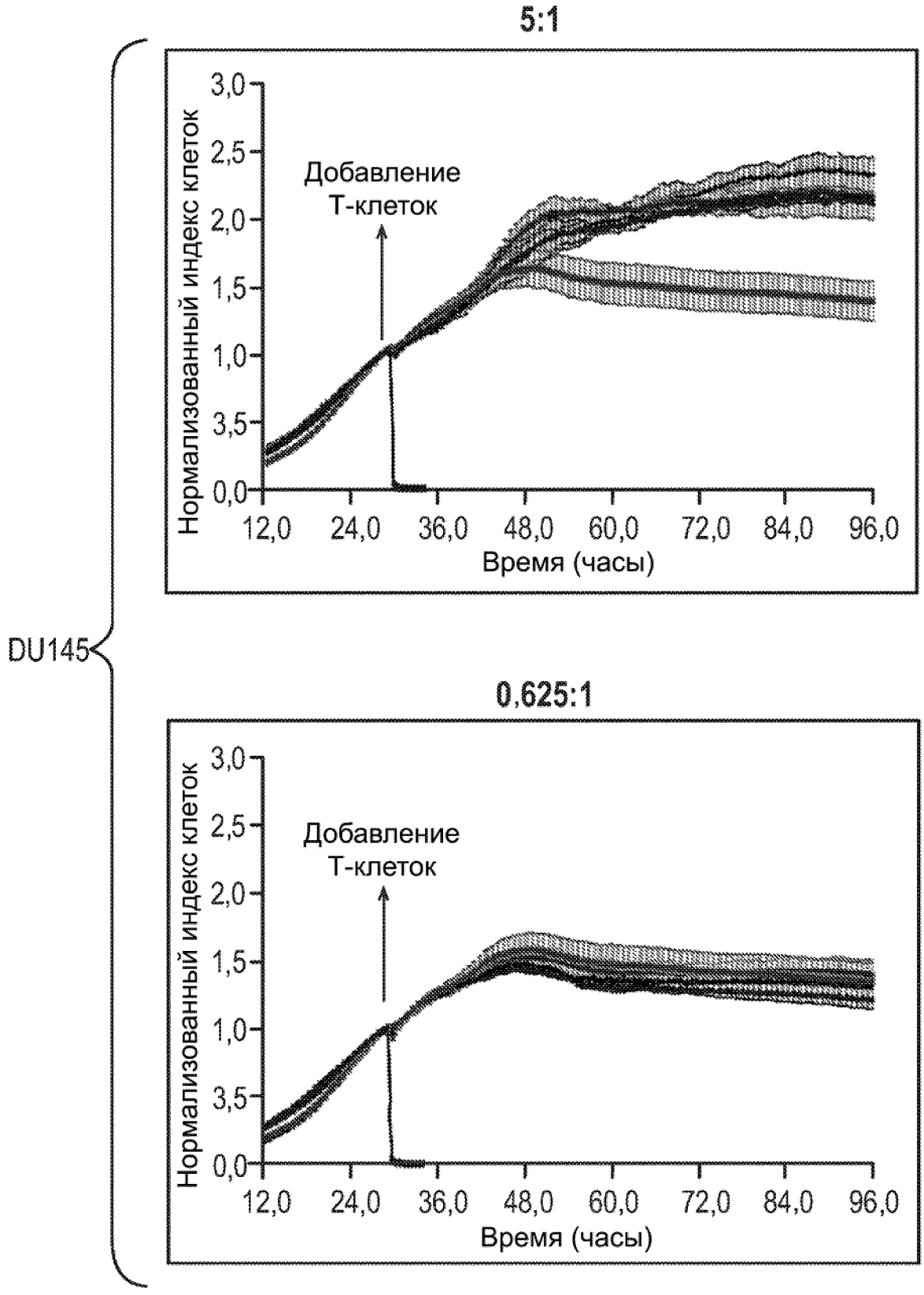
1,25:1



0,156:1



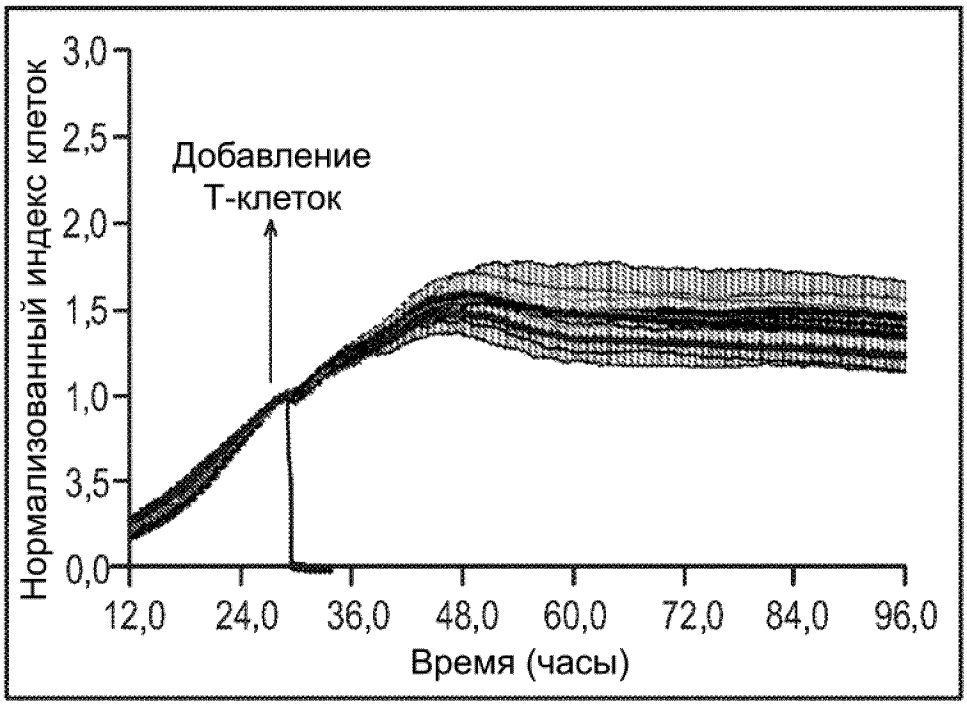
Фиг. 15


5:1
Нормализованный индекс клеток
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
3,5
0,0
Добавление
Т-клеток
12,0
24,0
36,0
48,0
60,0
72,0
84,0
96,0
Время (часы)
DU145
0,625:1
Нормализованный индекс клеток
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
3,5
0,0
Добавление
Т-клеток
12,0
24,0
36,0
48,0
60,0
72,0
84,0
96,0
Время (часы)

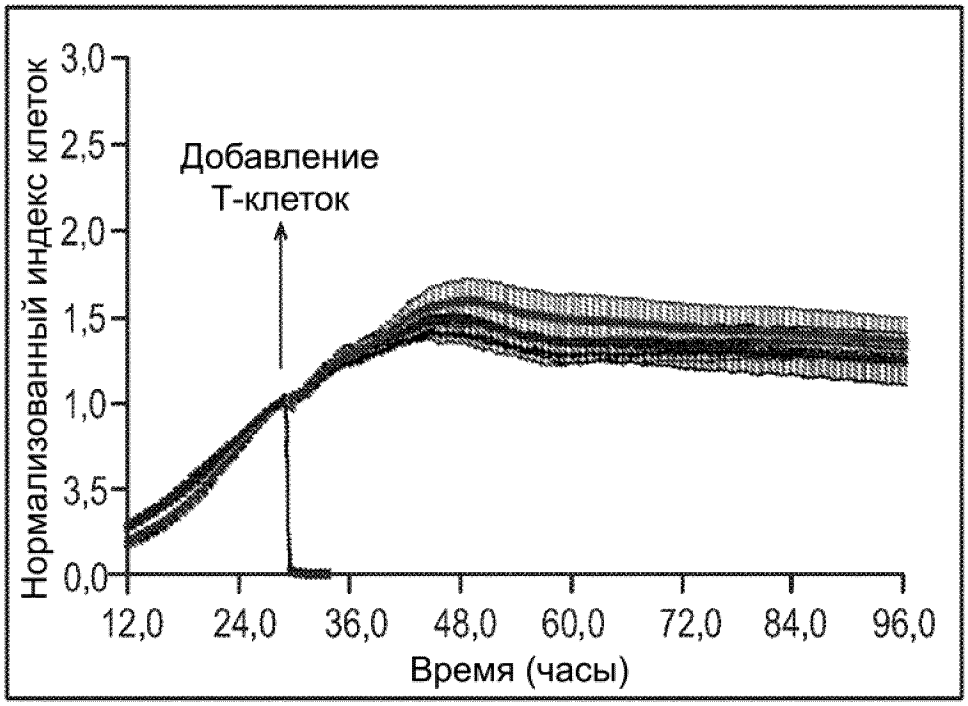
Фиг. 15 (продолж.)

DU145

2,5:1



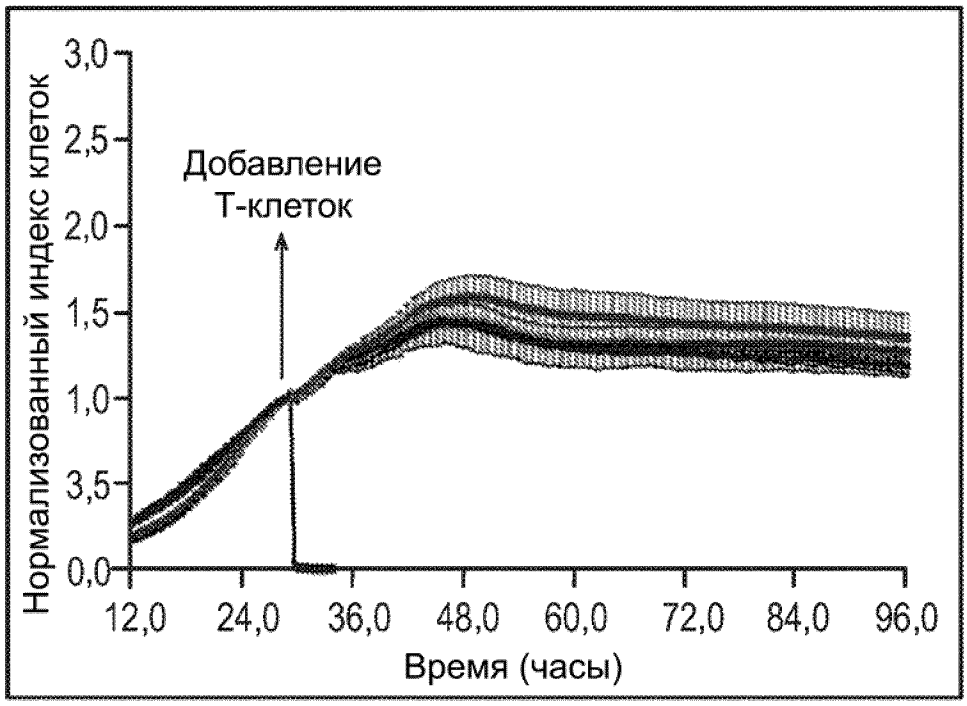
0,312:1



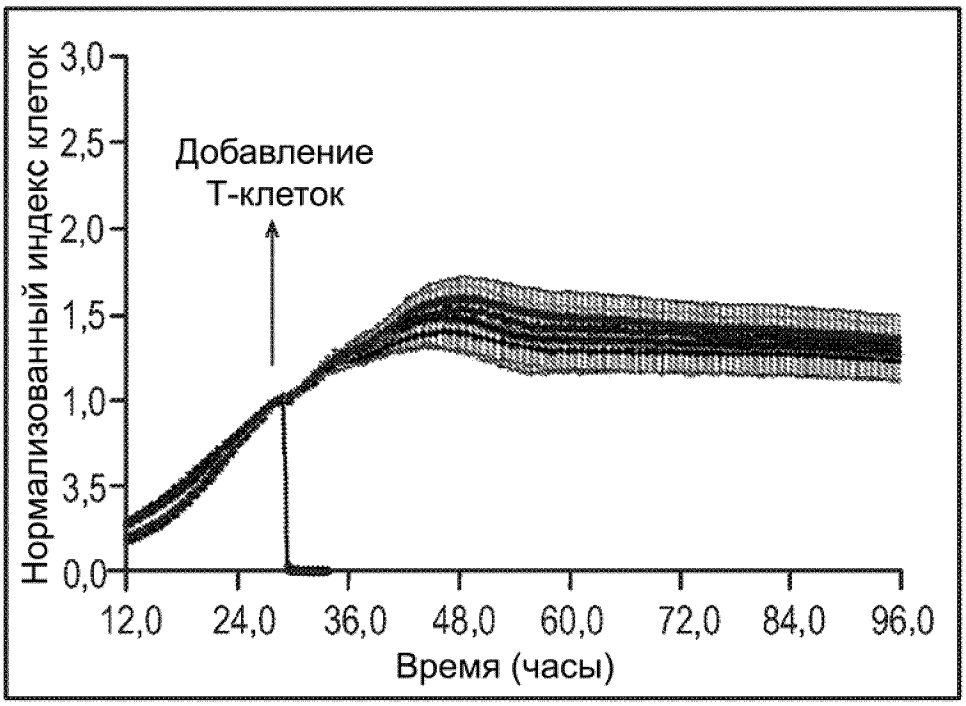
Фиг. 15 (продолж.)

DU145

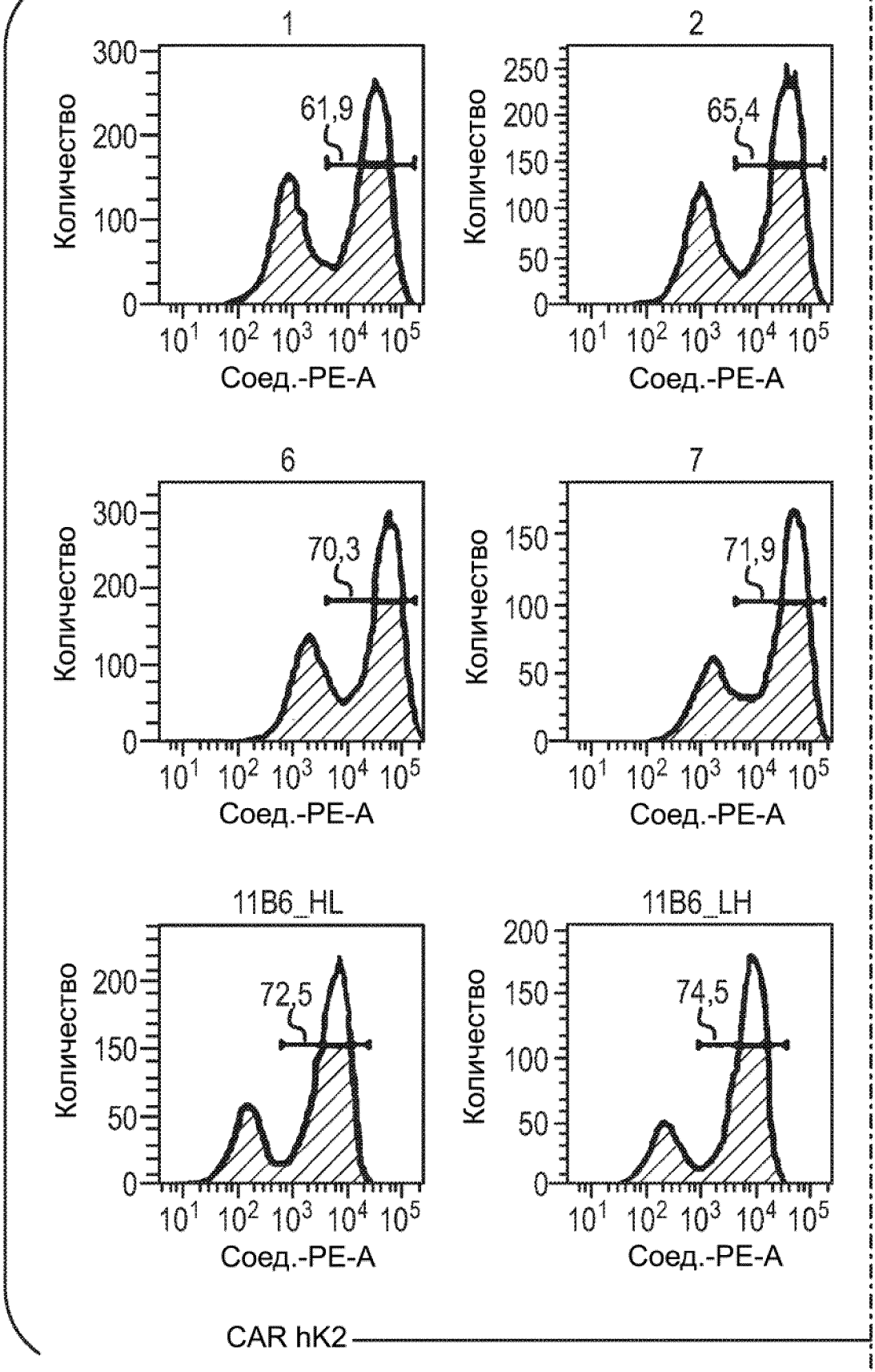
1,25:1



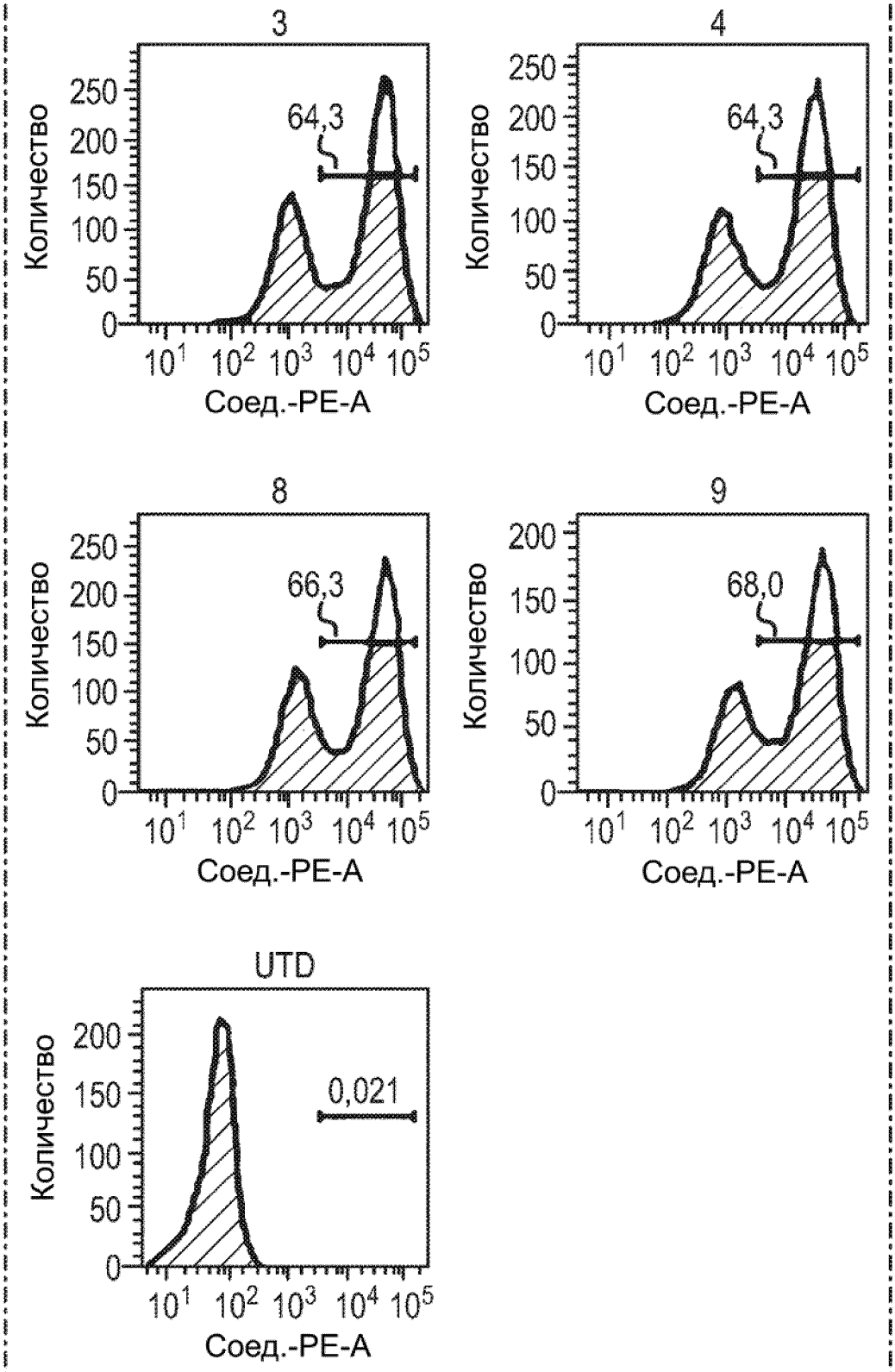
0,156:1



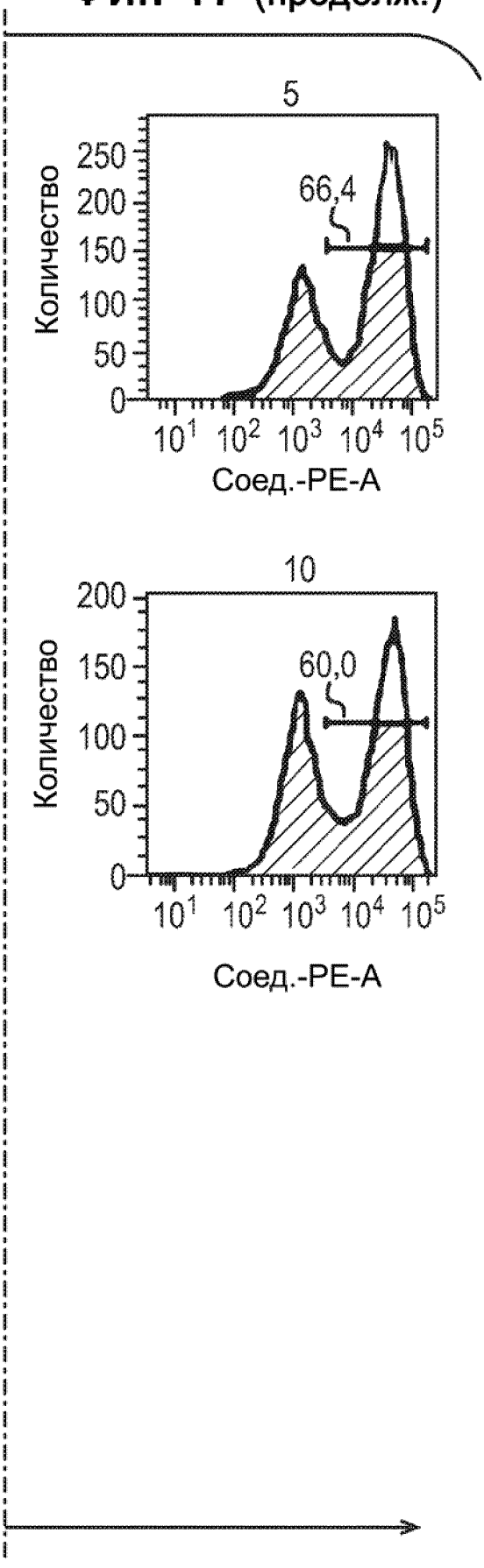
Фиг. 17


1
2
6
7
11B6_HL
11B6_LH
61,9
65,4
70,3
71,9
72,5
74,5
Количество
Соед.-PE-A
CAR hK2

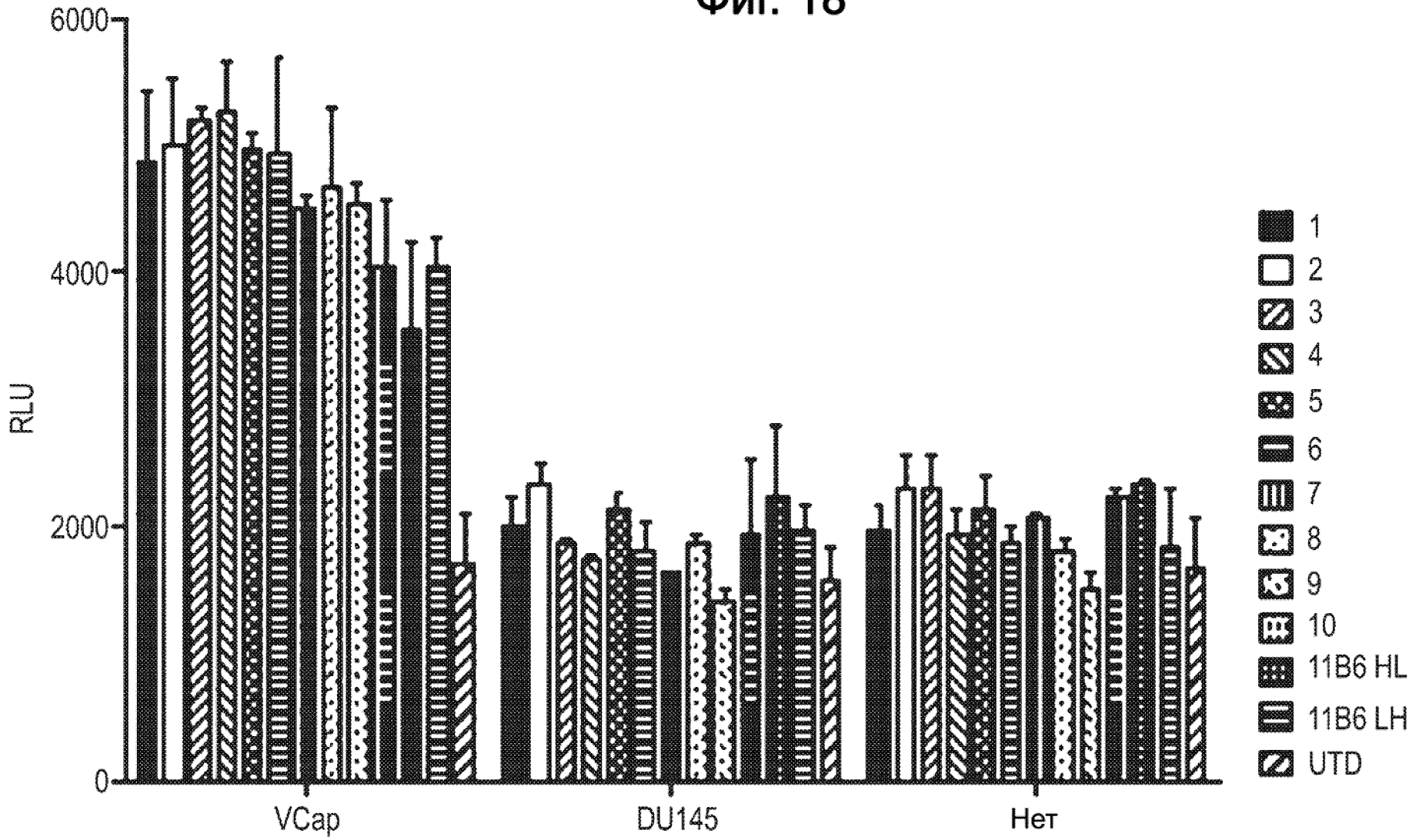
Фиг. 17 (продолж.)



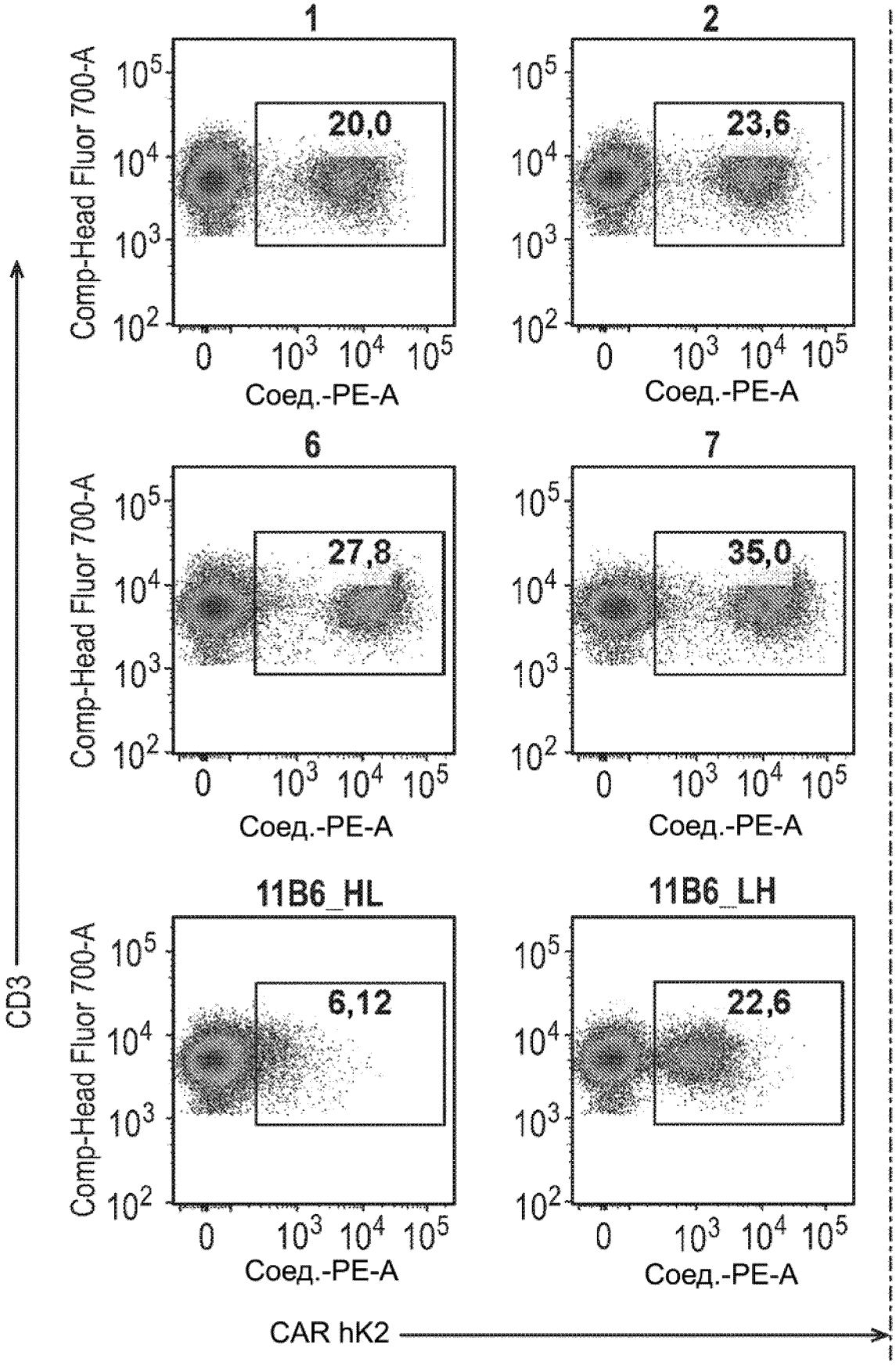
Фиг. 17 (продолж.)



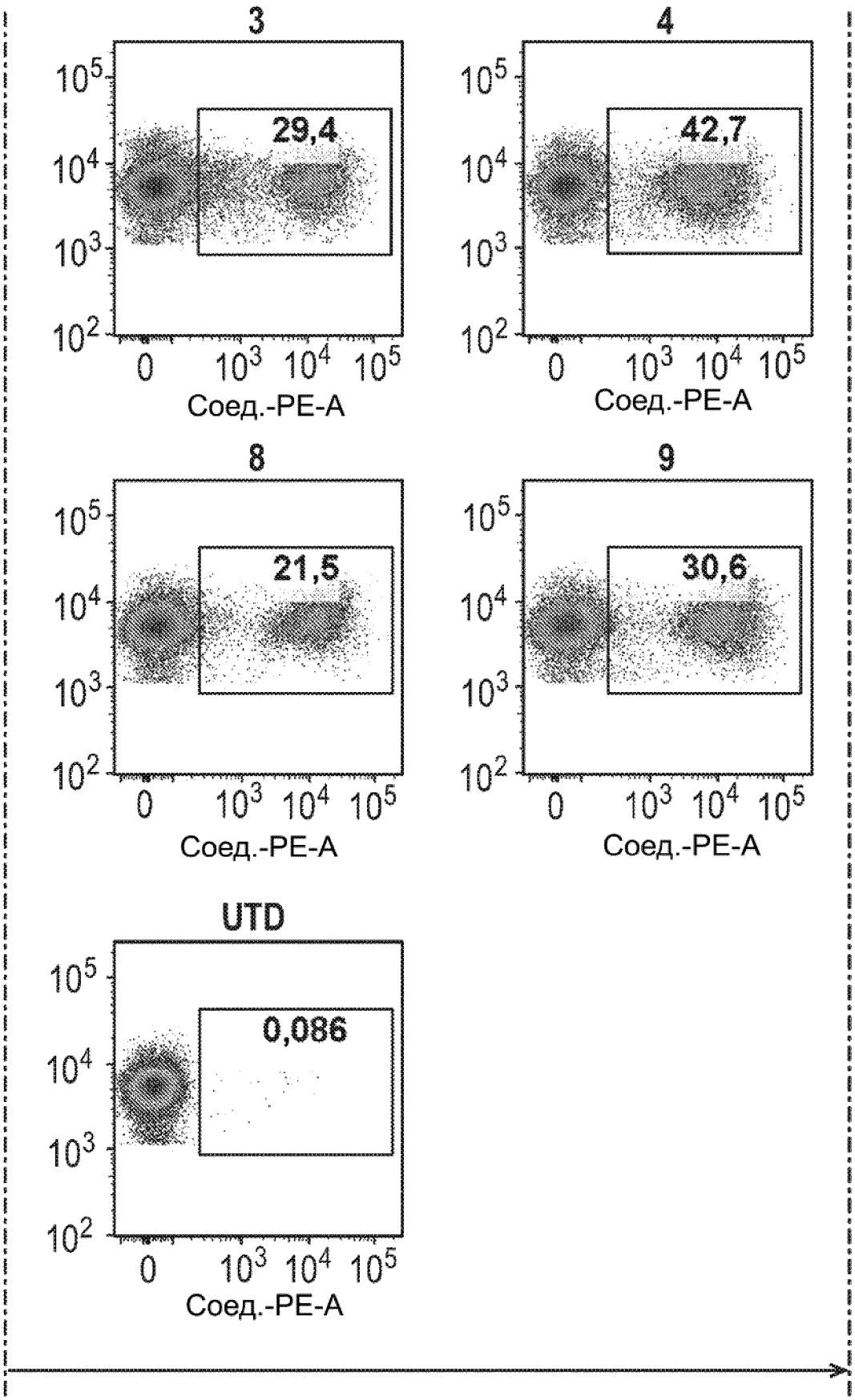
Фиг. 18


6000
4000
2000
0
RLU
VCap
DU145
Нет
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11B6 HL
11B6 LH
UTD

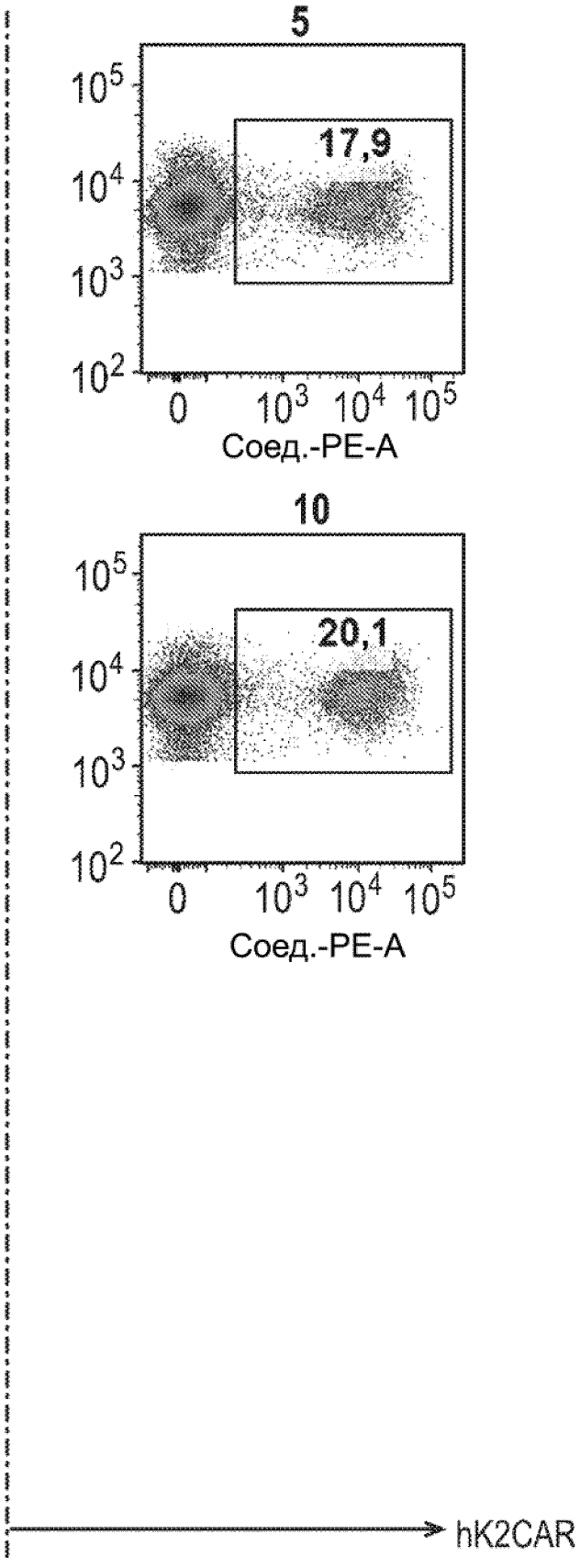
Фиг. 19

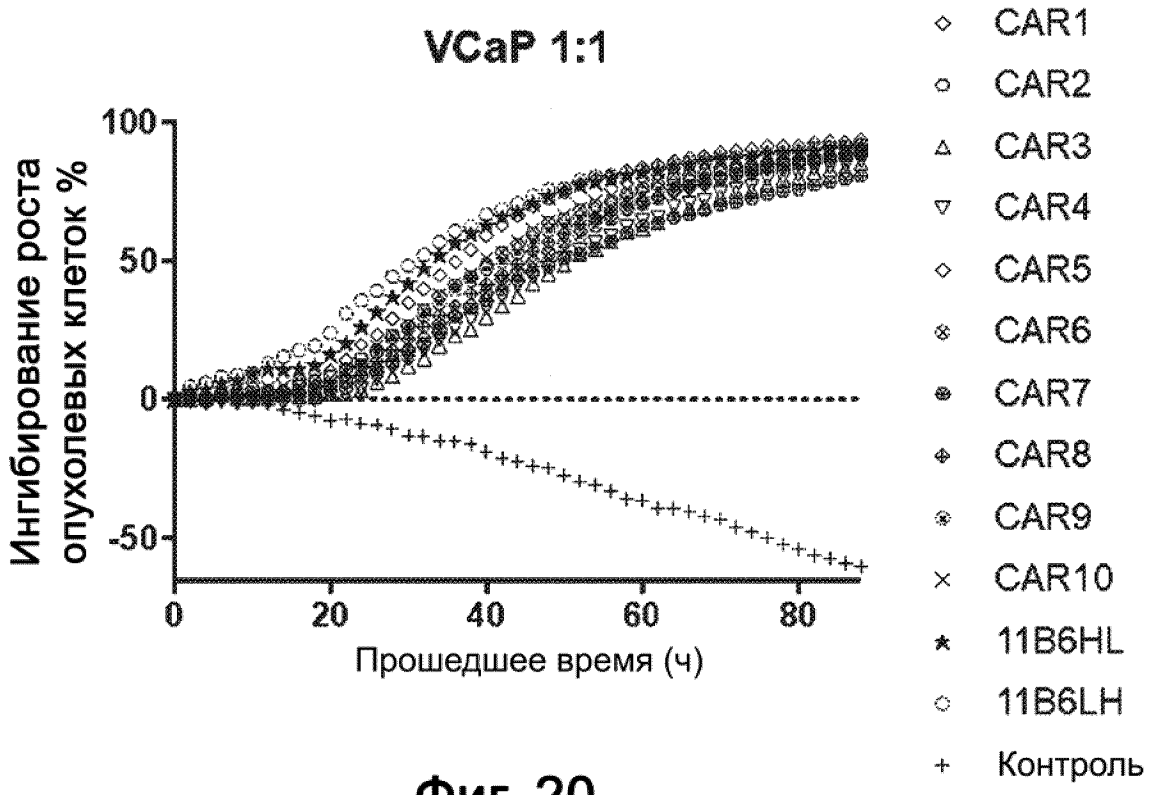

1
2
6
7
11B6_HL
11B6_LH
20,0
23,6
27,8
35,0
6,12
22,6
Comp-Head Fluor 700-A
Соед.-PE-A
CD3
CAR hK2

Фиг. 19 (продолж.)

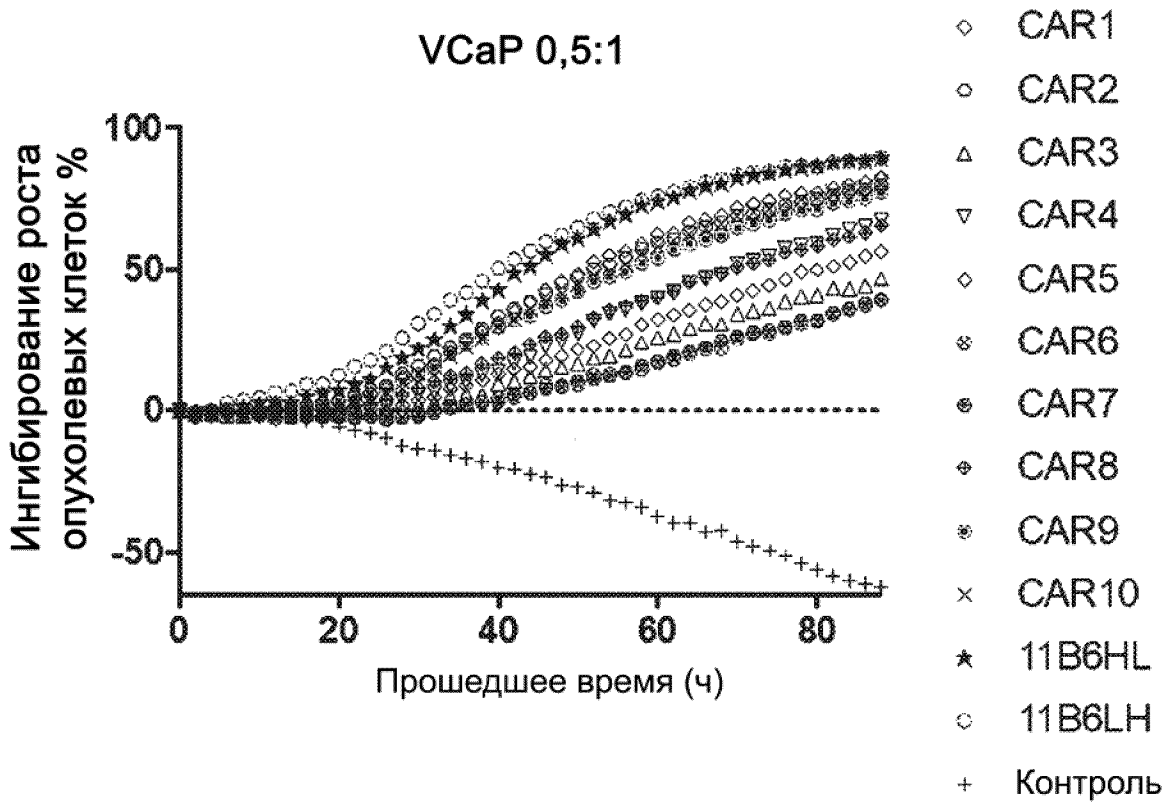


Фиг. 19 (продолж.)

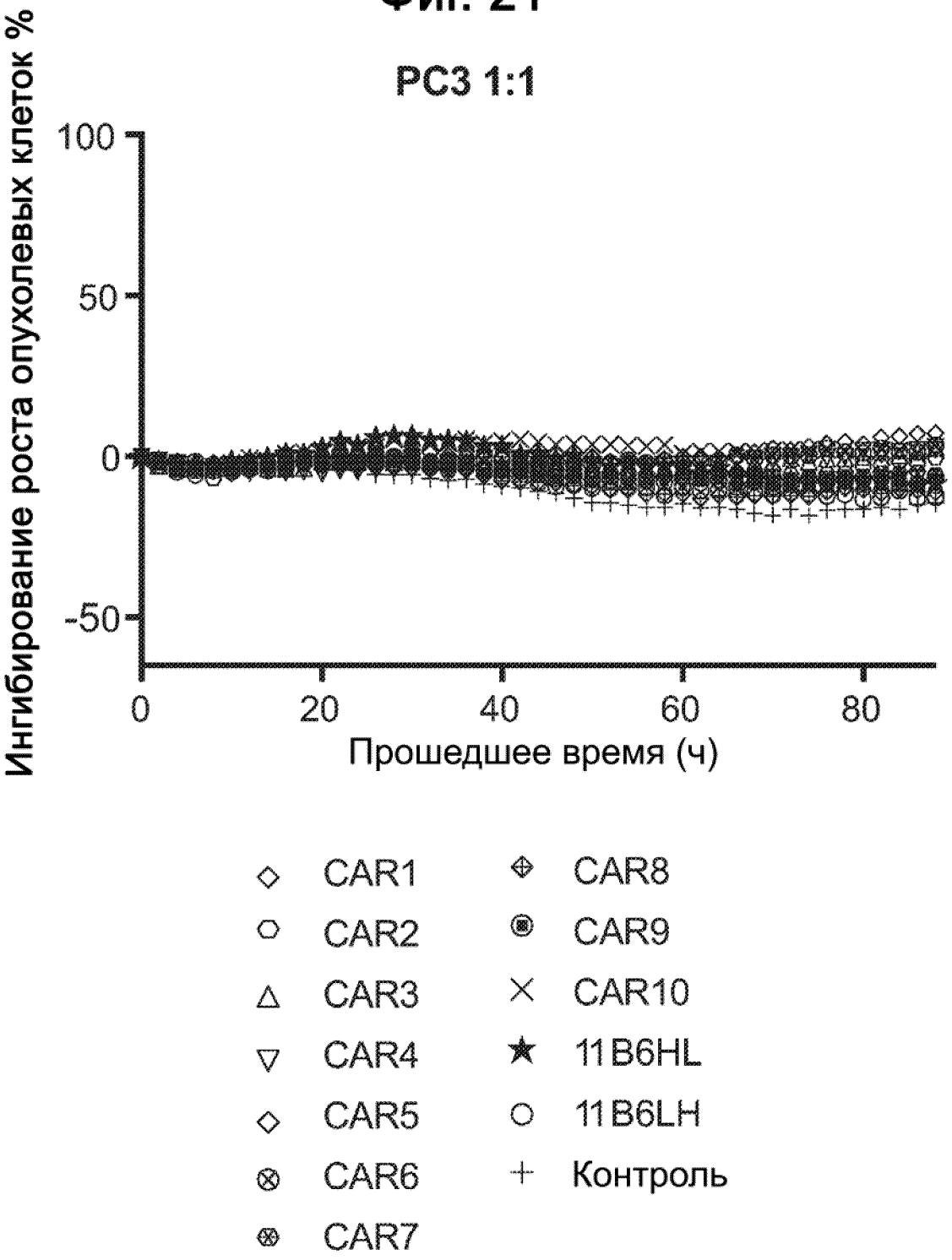


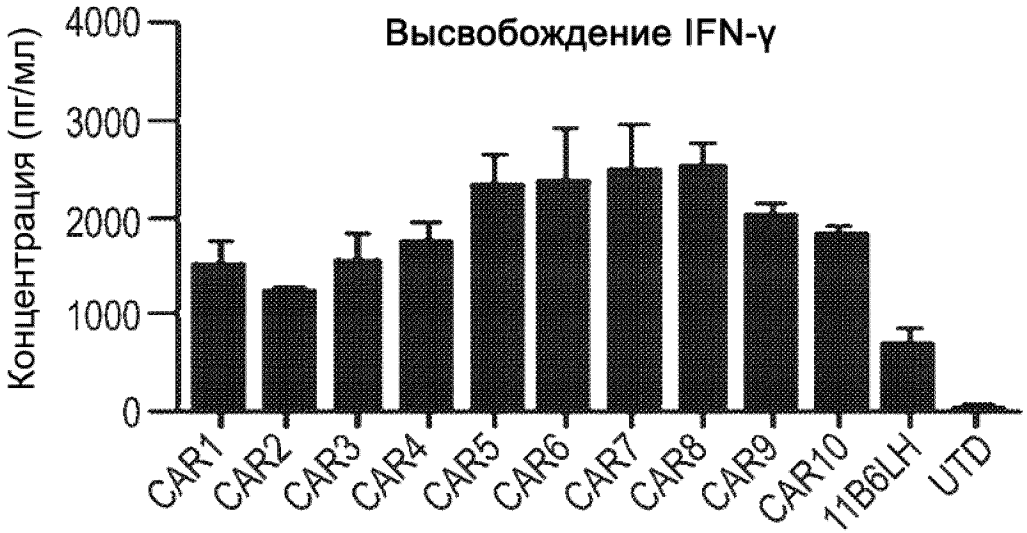

VCaP 1:1
Ингибирование роста опухолевых клеток %
100
50
0
-50
0
20
40
60
80
Прошедшее время (ч)
CAR1
CAR2
CAR3
CAR4
CAR5
CAR6
CAR7
CAR8
CAR9
CAR10
11B6HL
11B6LH
Контроль

Фиг. 20

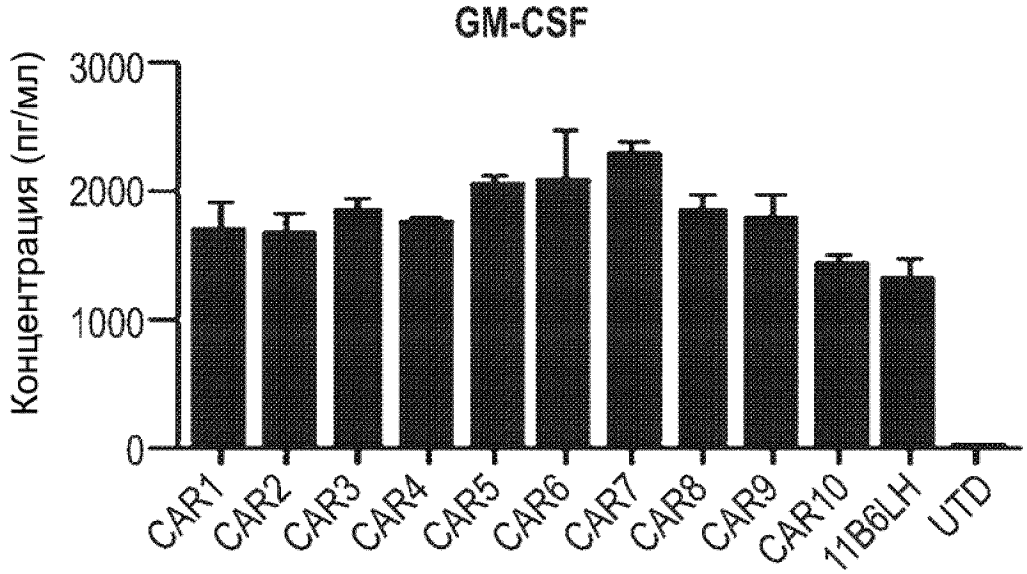

VCaP 0,5:1
Ингибирование роста опухолевых клеток %
100
50
0
-50
0
20
40
60
80
Прошедшее время (ч)
CAR1
CAR2
CAR3
CAR4
CAR5
CAR6
CAR7
CAR8
CAR9
CAR10
11B6HL
11B6LH
Контроль

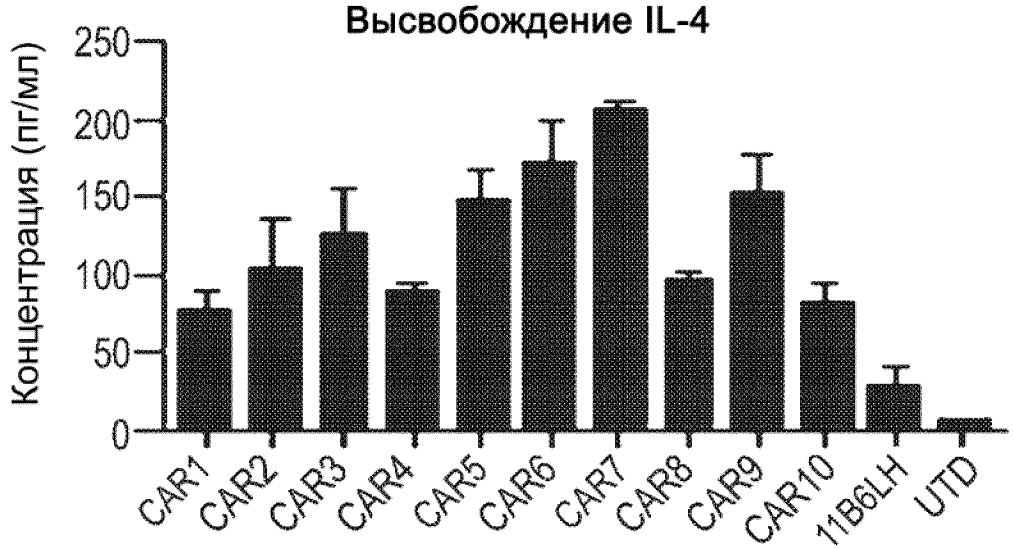
Фиг. 21

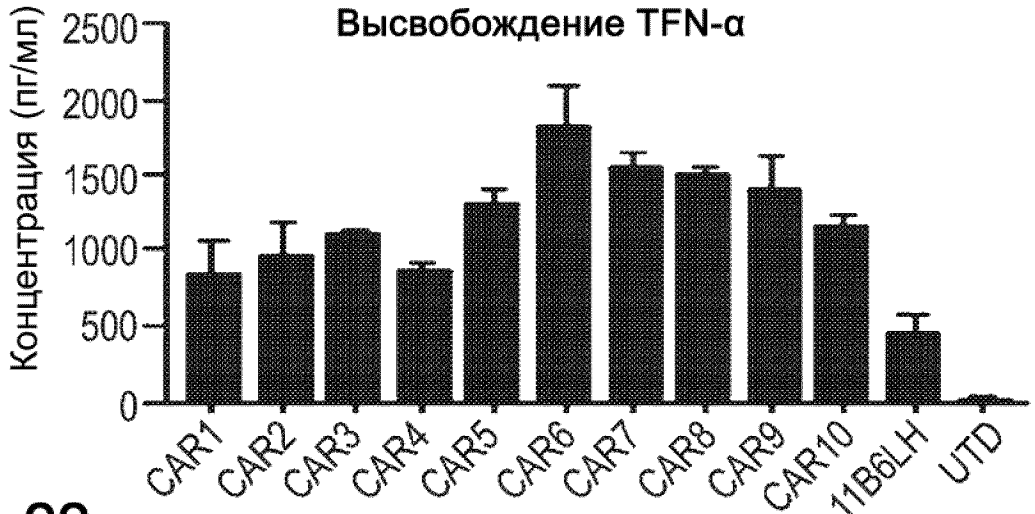

PC3 1:1
Ингибирование роста опухолевых клеток %
100
50
0
-50
0
20
40
60
80
Прошедшее время (ч)
CAR1
CAR2
CAR3
CAR4
CAR5
CAR6
CAR7
CAR8
CAR9
CAR10
11B6HL
11B6LH
Контроль


Высвобождение IFN-γ
Концентрация (пг/мл)
4000
3000
2000
1000
0
CAR1
CAR2
CAR3
CAR4
CAR5
CAR6
CAR7
CAR8
CAR9
CAR10
11B6LH
UTD

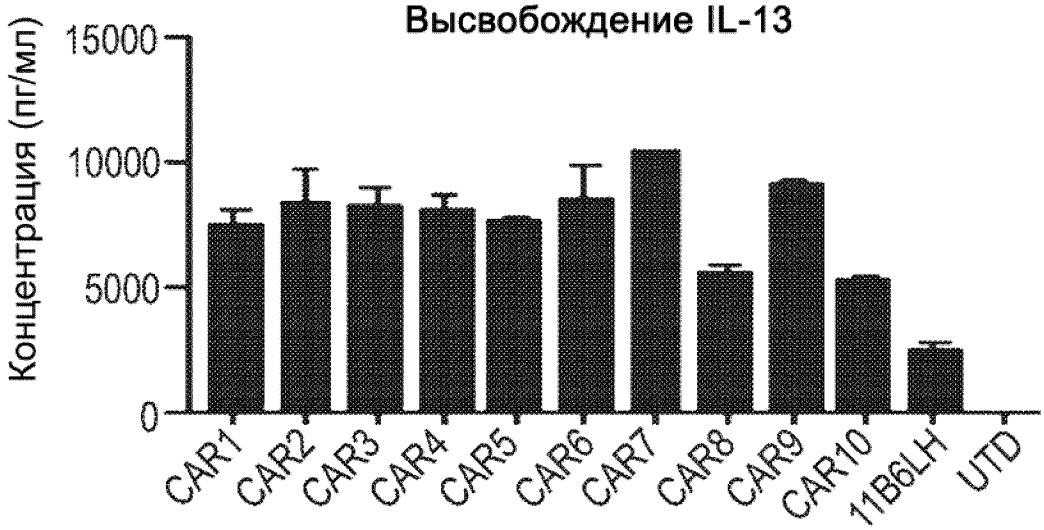
Фиг. 22

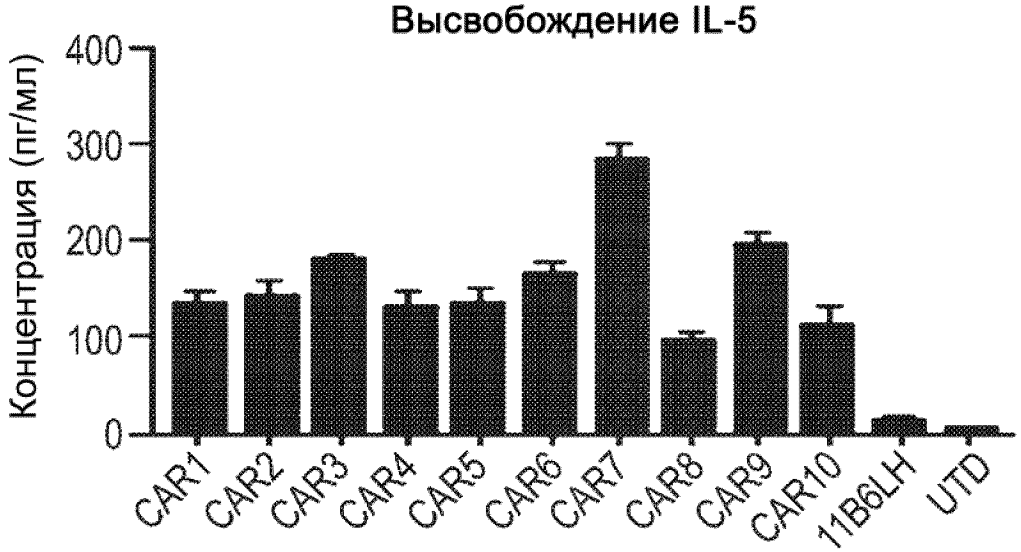

GM-CSF
Концентрация (пг/мл)
3000
2000
1000
0
CAR1
CAR2
CAR3
CAR4
CAR5
CAR6
CAR7
CAR8
CAR9
CAR10
11B6LH
UTD

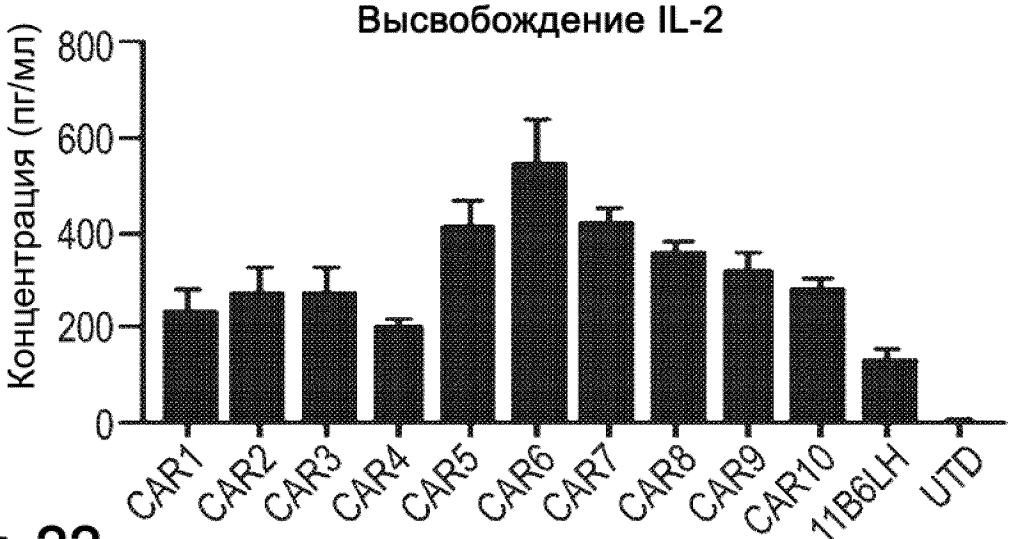

Высвобождение IL-4
Концентрация (пг/мл)
250
200
150
100
50
0
CAR1
CAR2
CAR3
CAR4
CAR5
CAR6
CAR7
CAR8
CAR9
CAR10
11B6LH
UTD



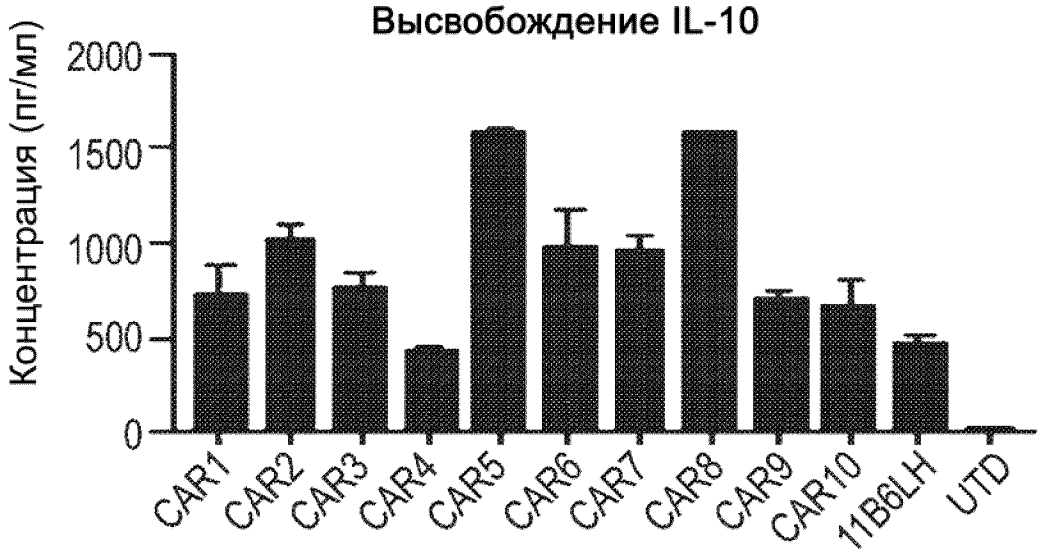
Фиг. 22
(продолж.)

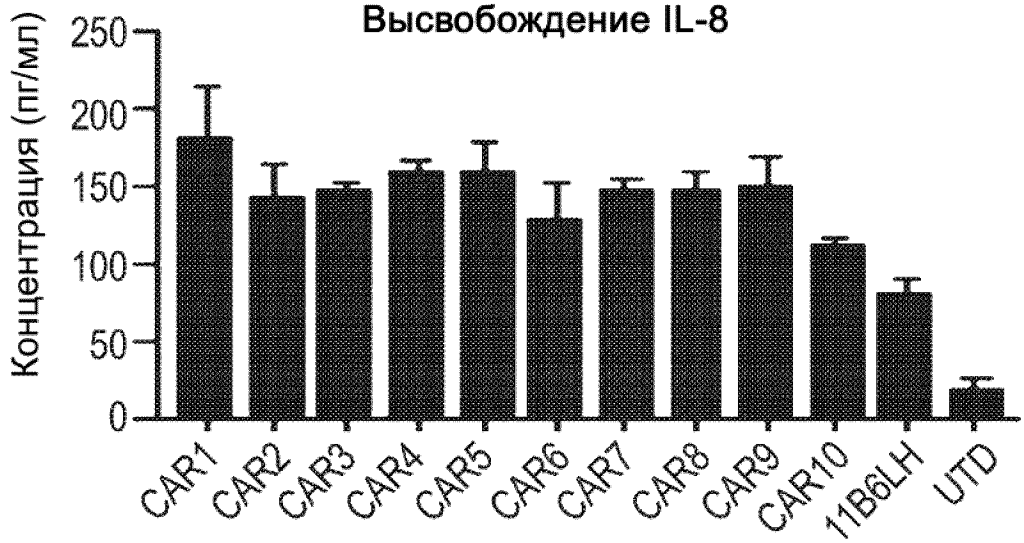




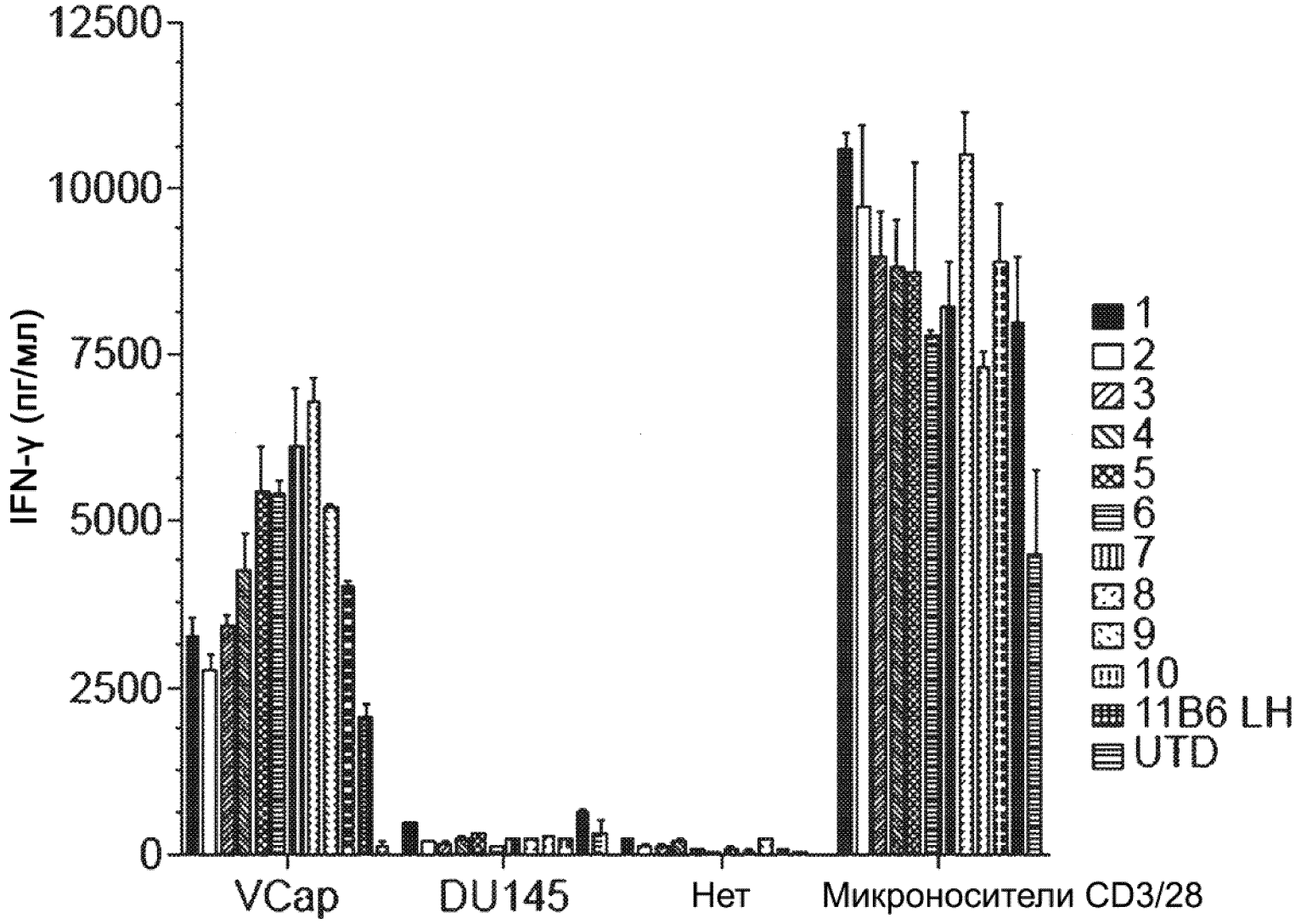


Фиг. 22
(продолж.)

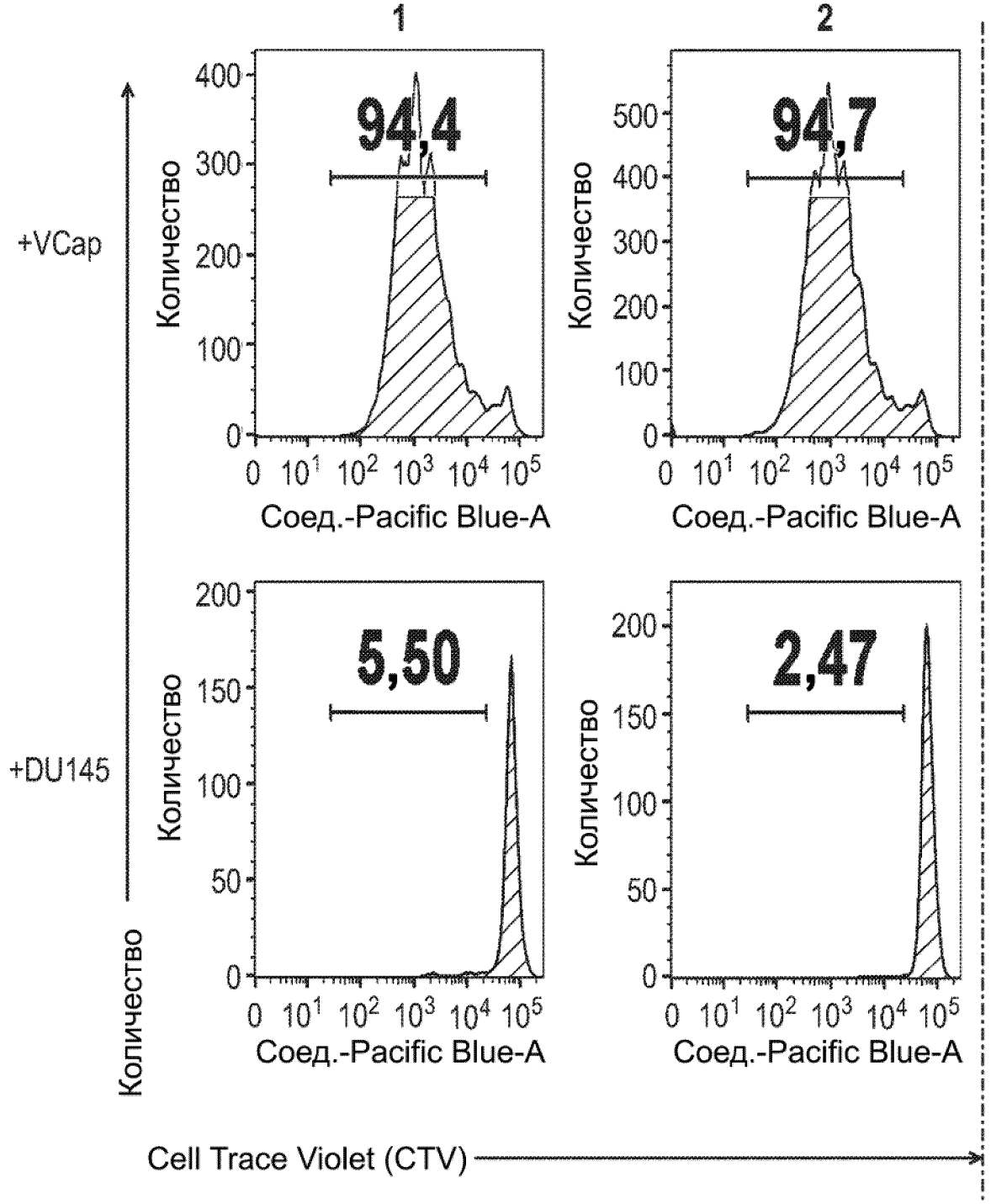




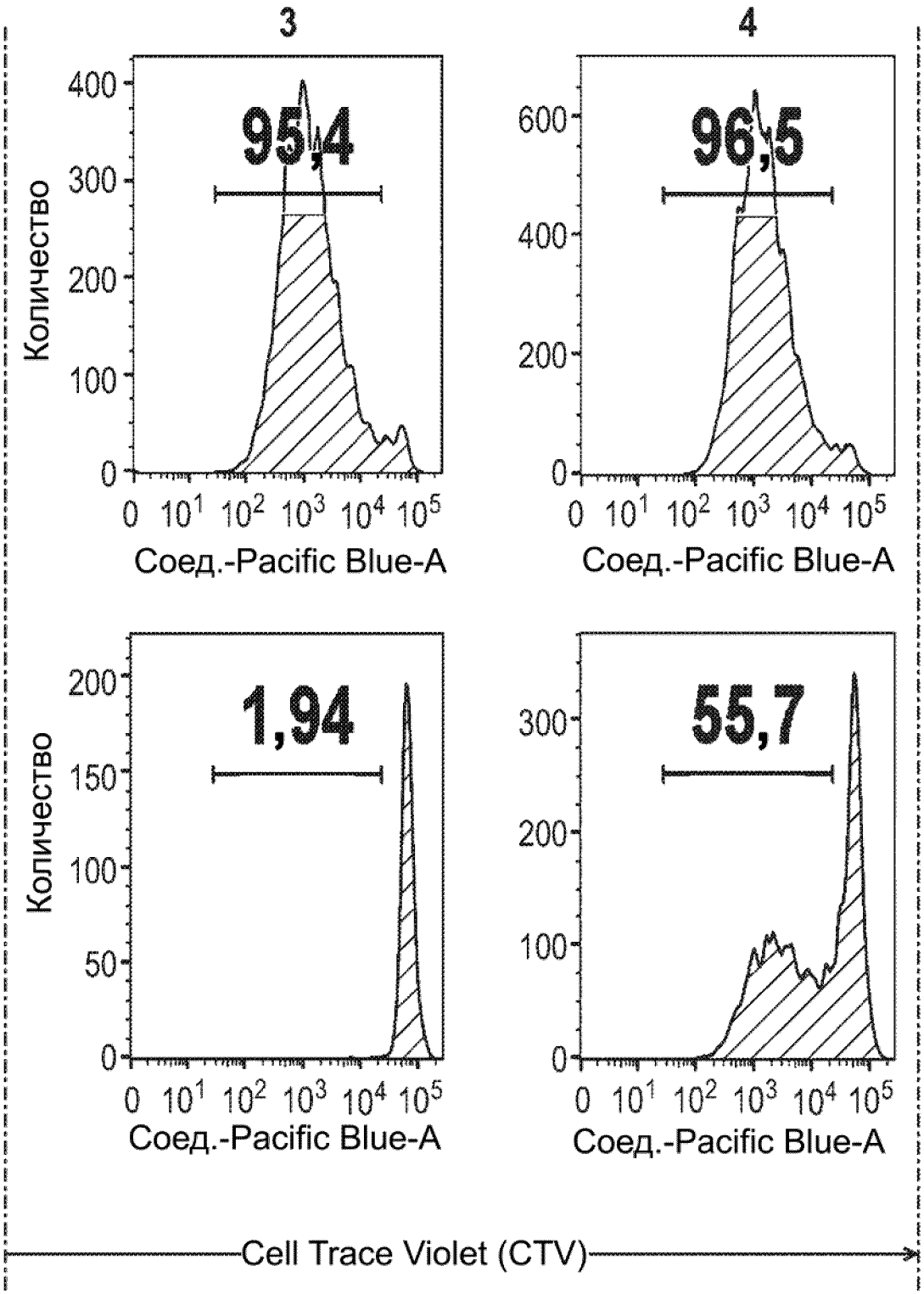
Фиг. 23


12500
10000
7500
5000
2500
0
IFN-γ (пг/мл)
VCap
DU145
Нет
Микроносители CD3/28
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11B6 LH
UTD

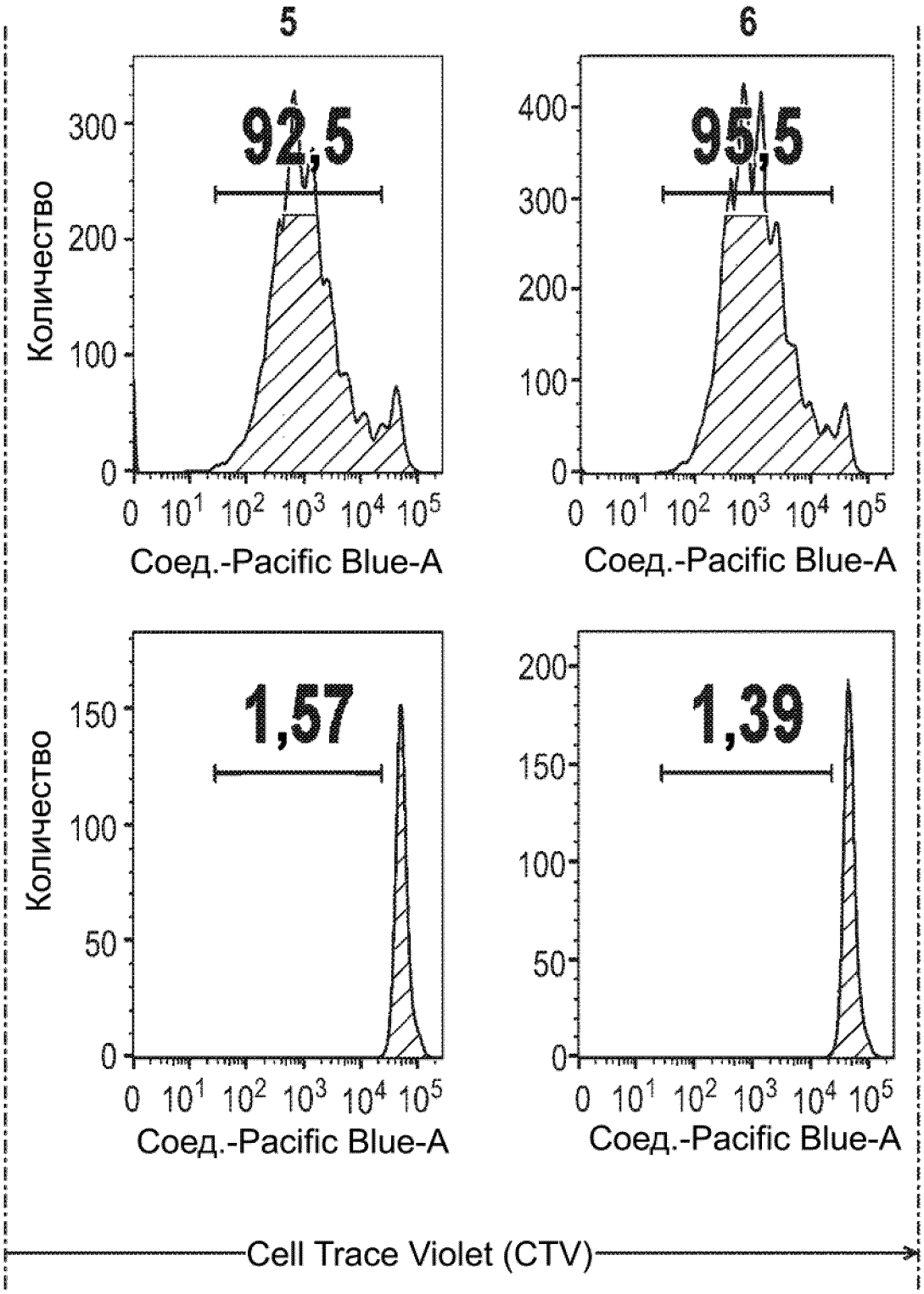
Фиг. 24A


1
2
+VCap
+DU145
Количество
94,4
94,7
5,50
2,47
Соед.-Pacific Blue-A
Cell Trace Violet (CTV)

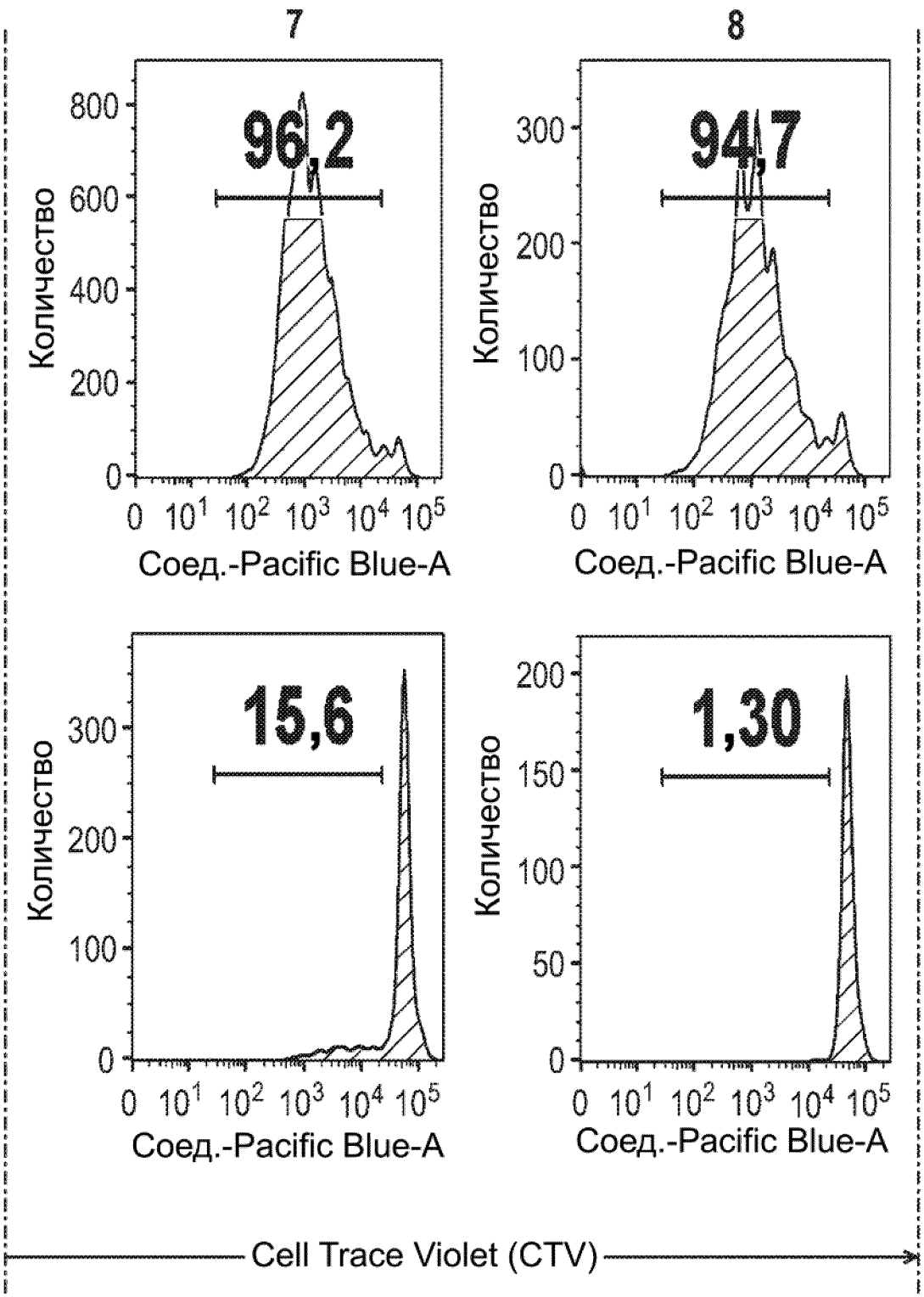
Фиг. 24A (продолж.)



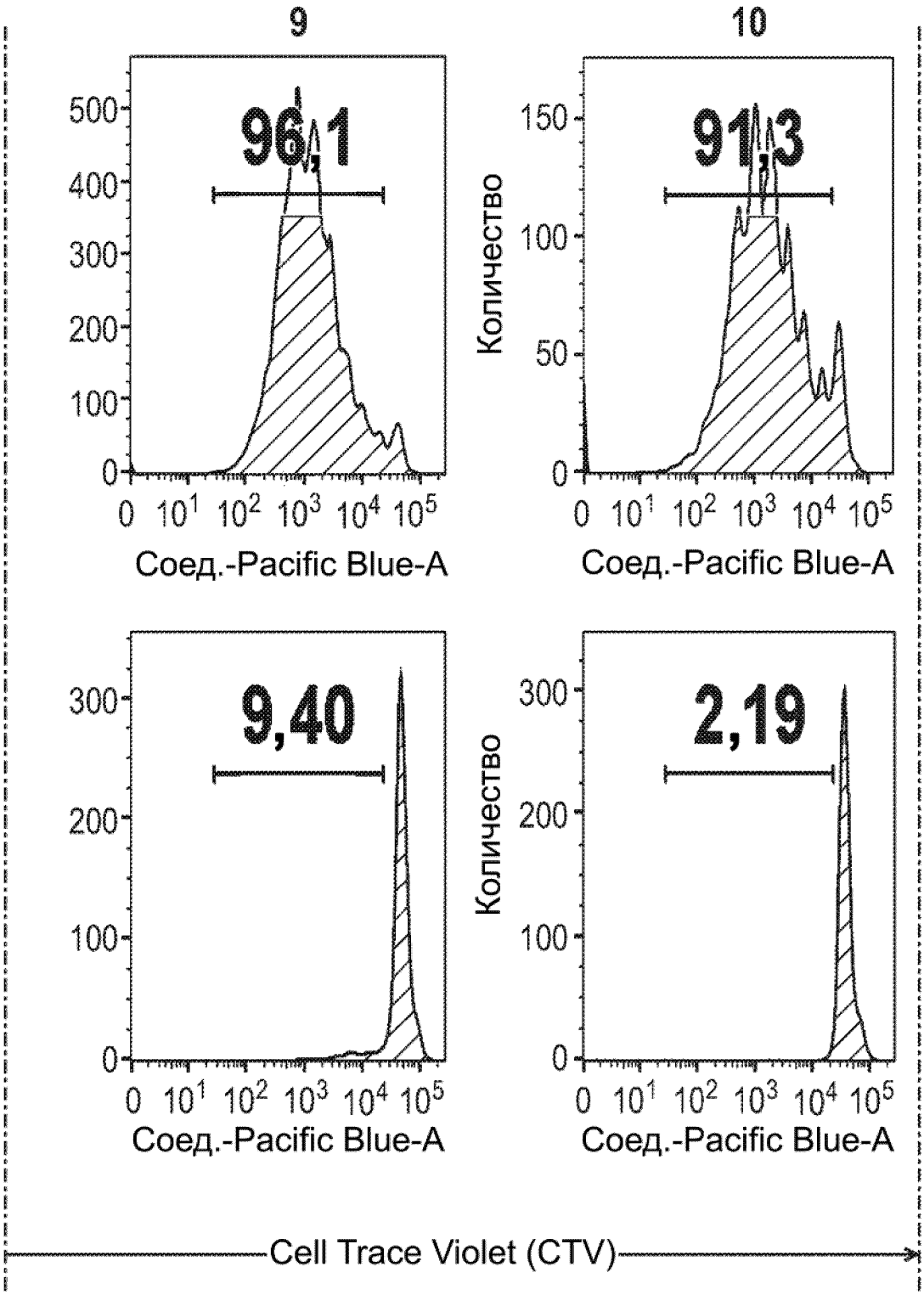
Фиг. 24A (продолж.)



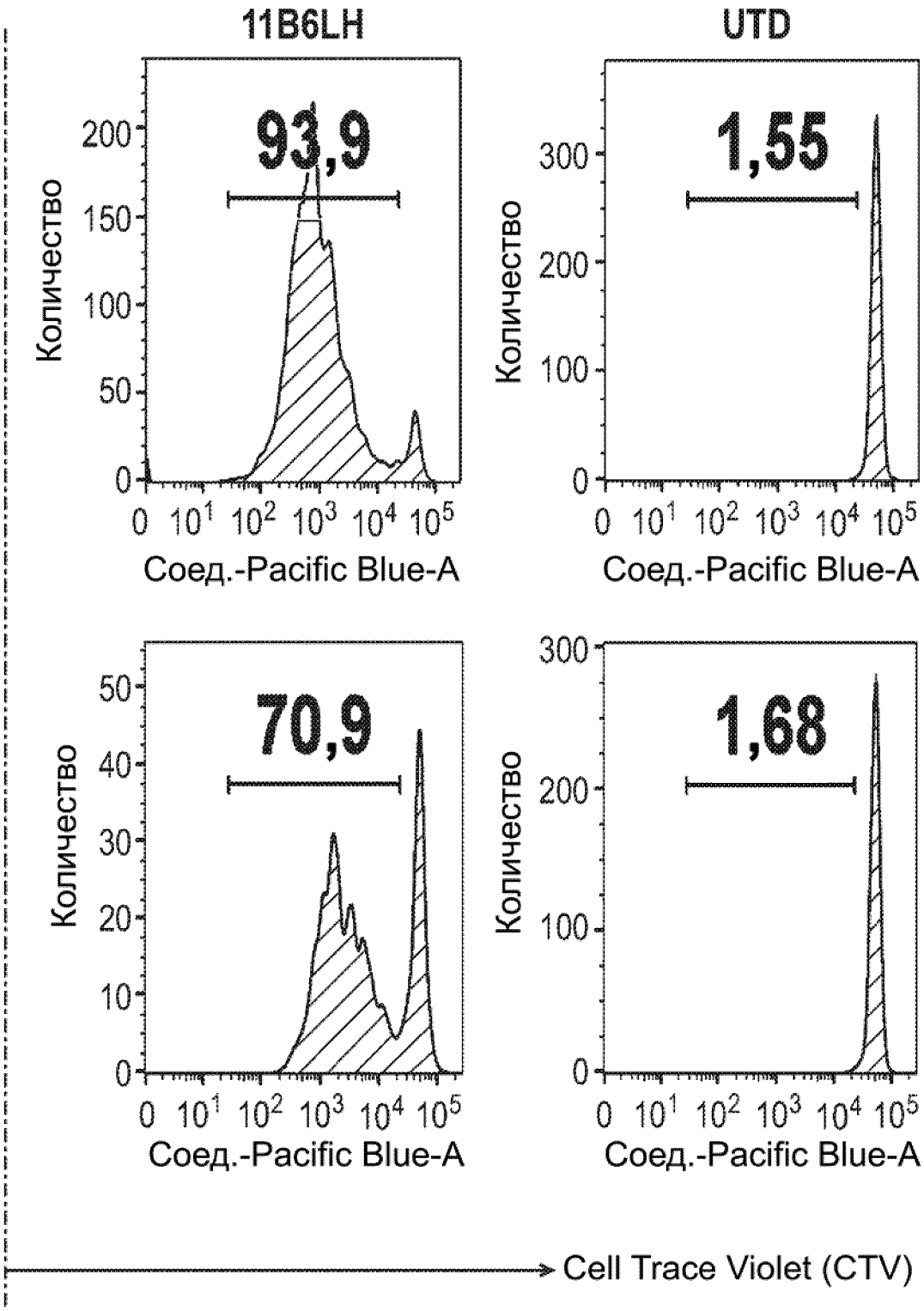
Фиг. 24A (продолж.)



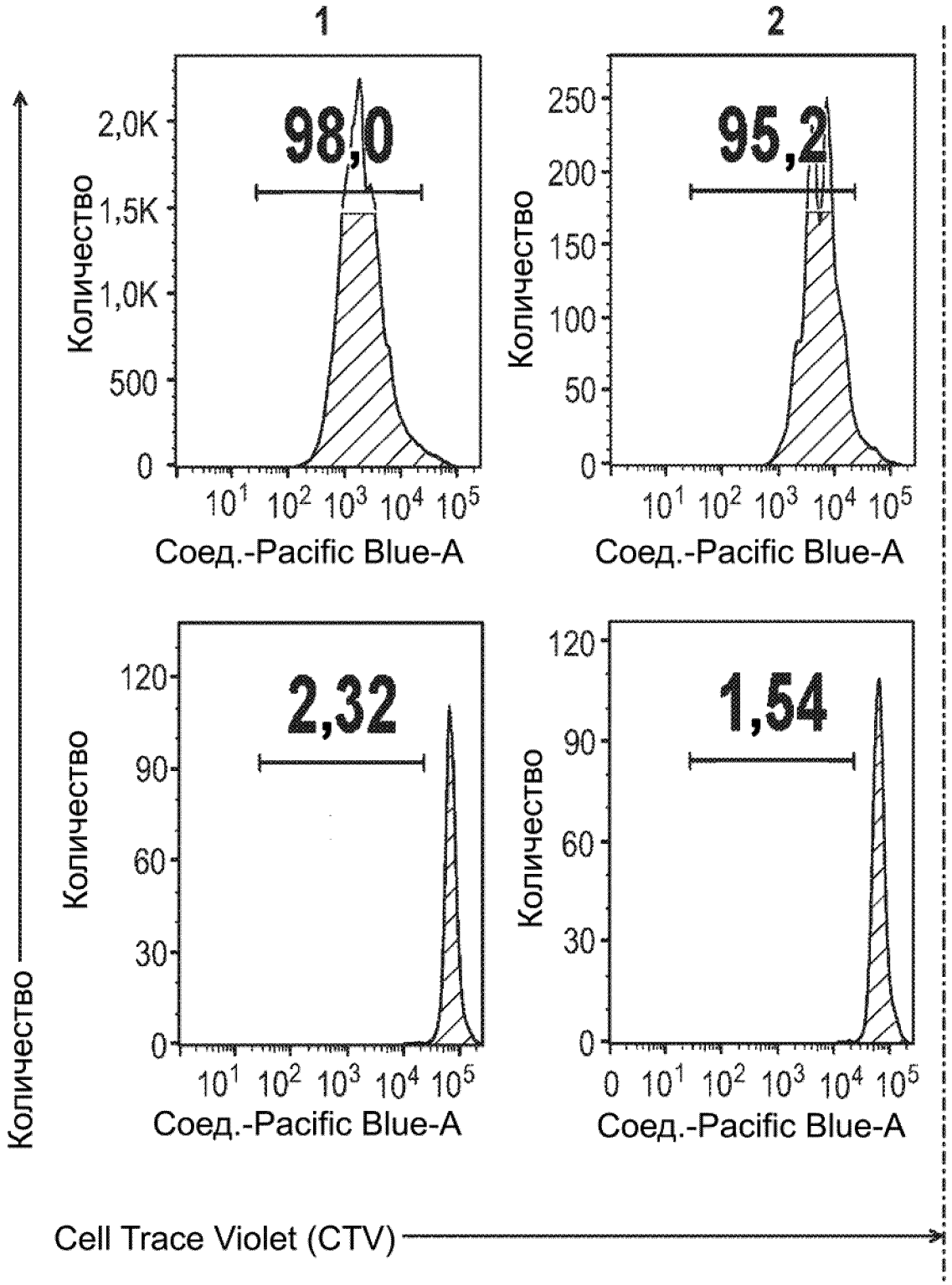
Фиг. 24A (продолж.)



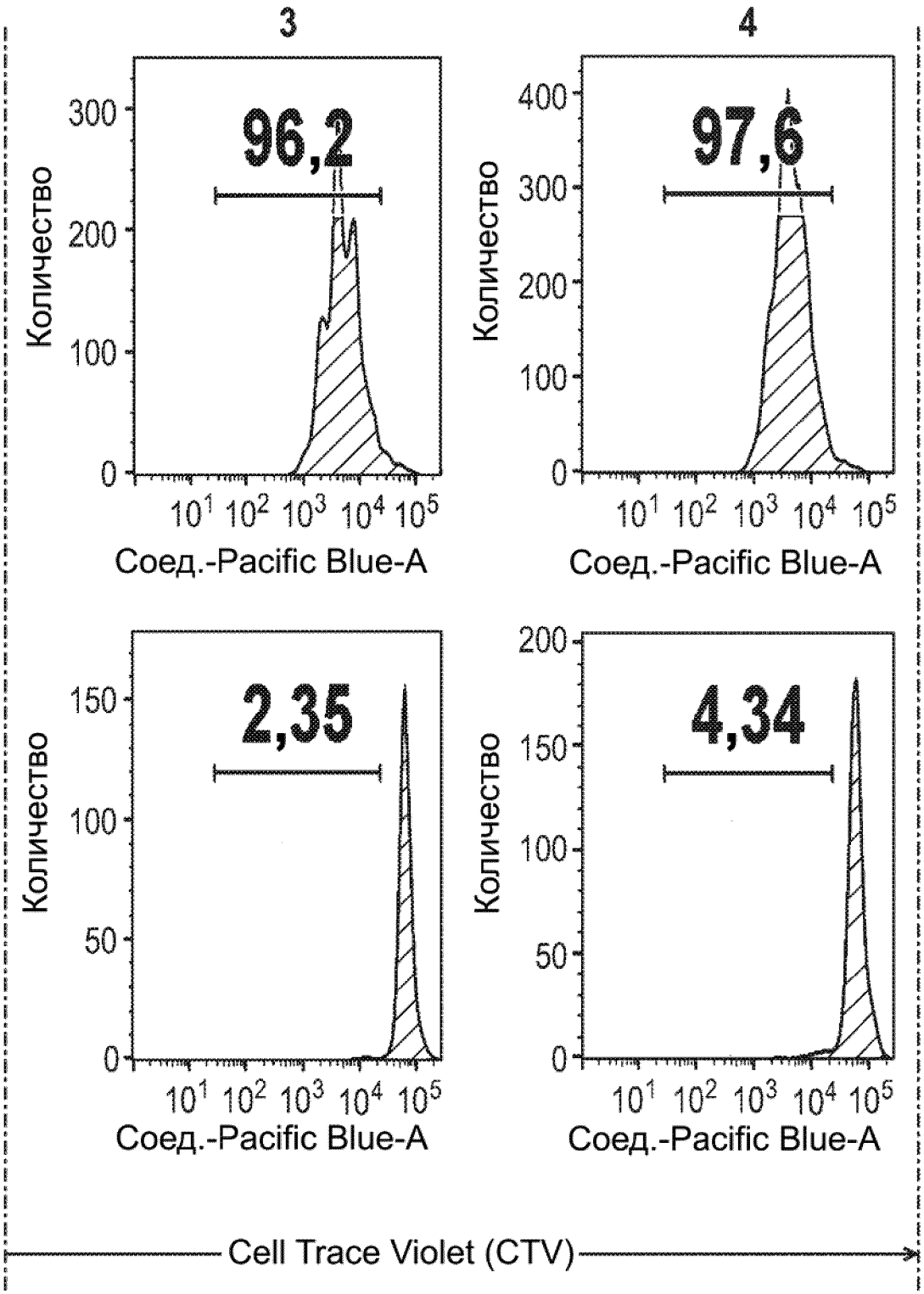
Фиг. 24A (продолж.)



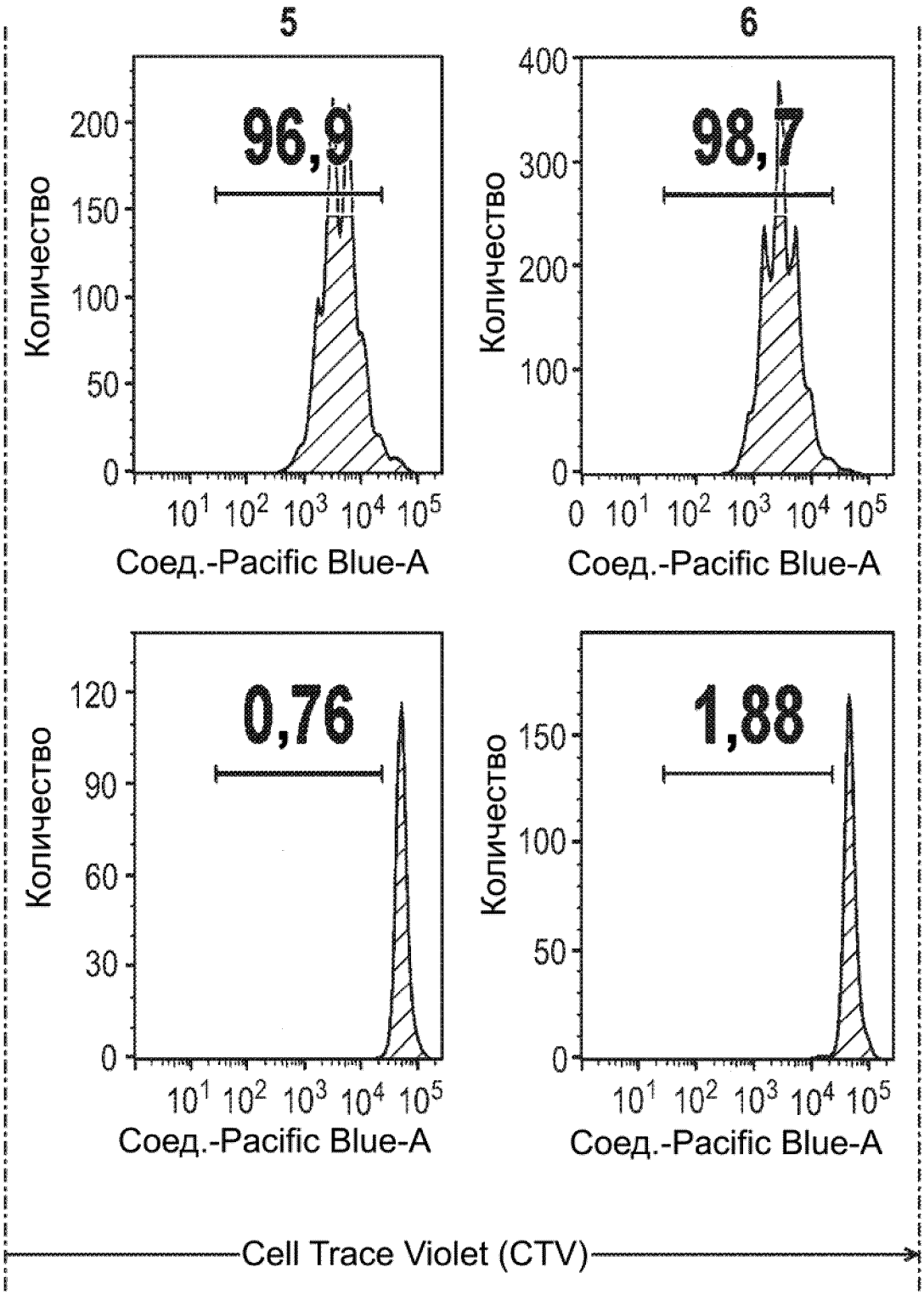
Фиг. 24B


1
2
98,0
95,2
2,32
1,54
Количество
Соед.-Pacific Blue-A
Cell Trace Violet (CTV)

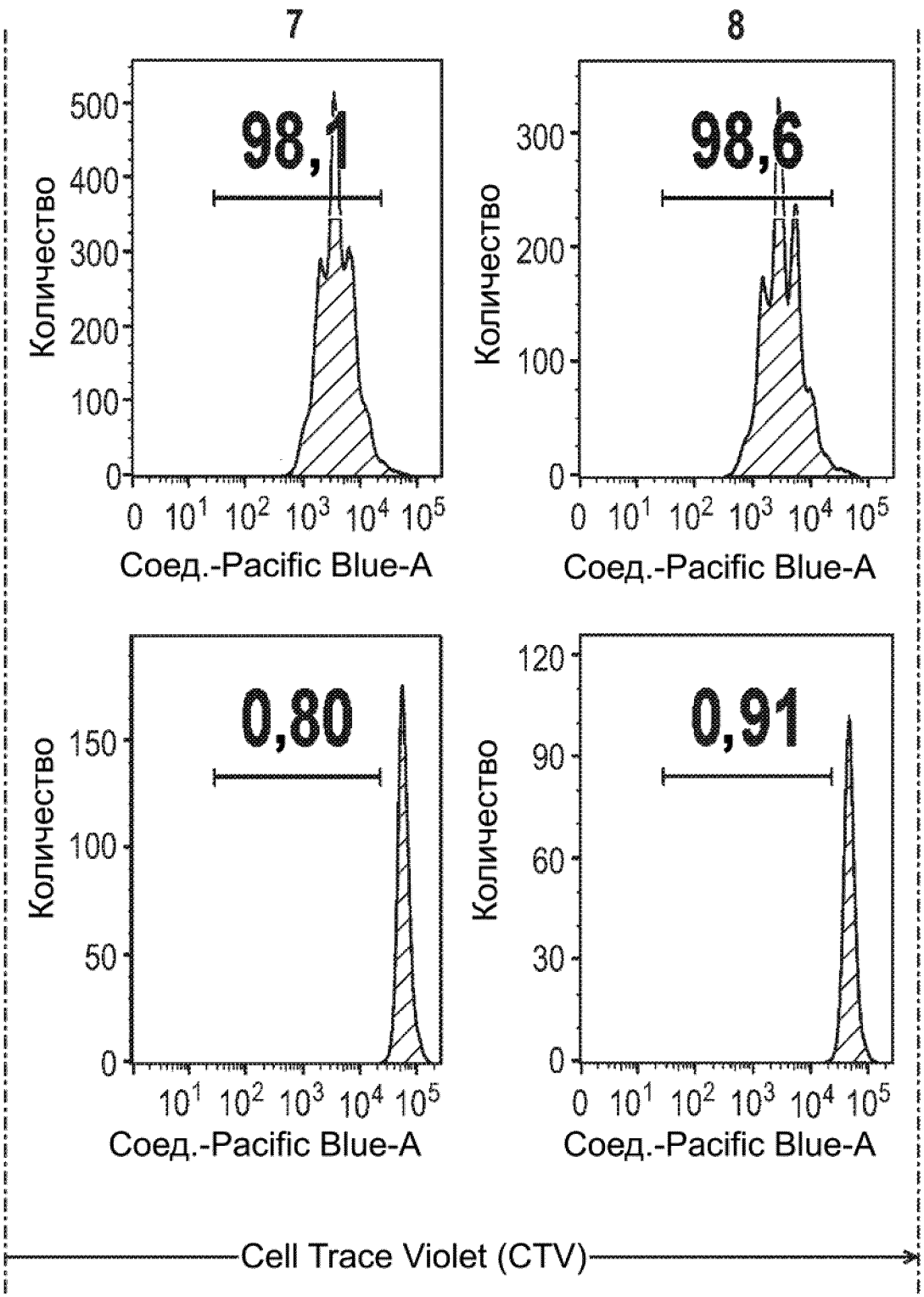
Фиг. 24B (продолж.)



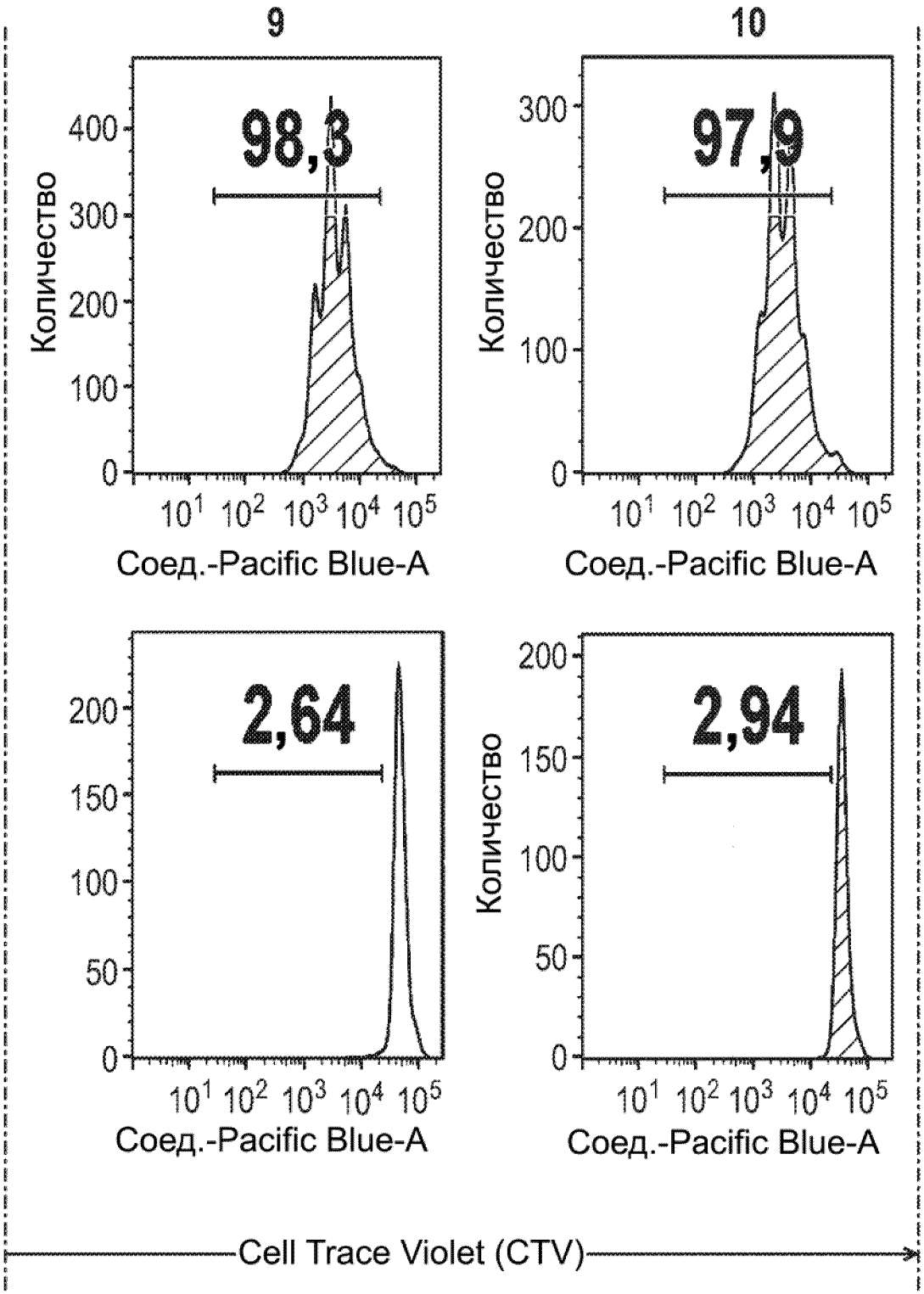
Фиг. 24B (продолж.)



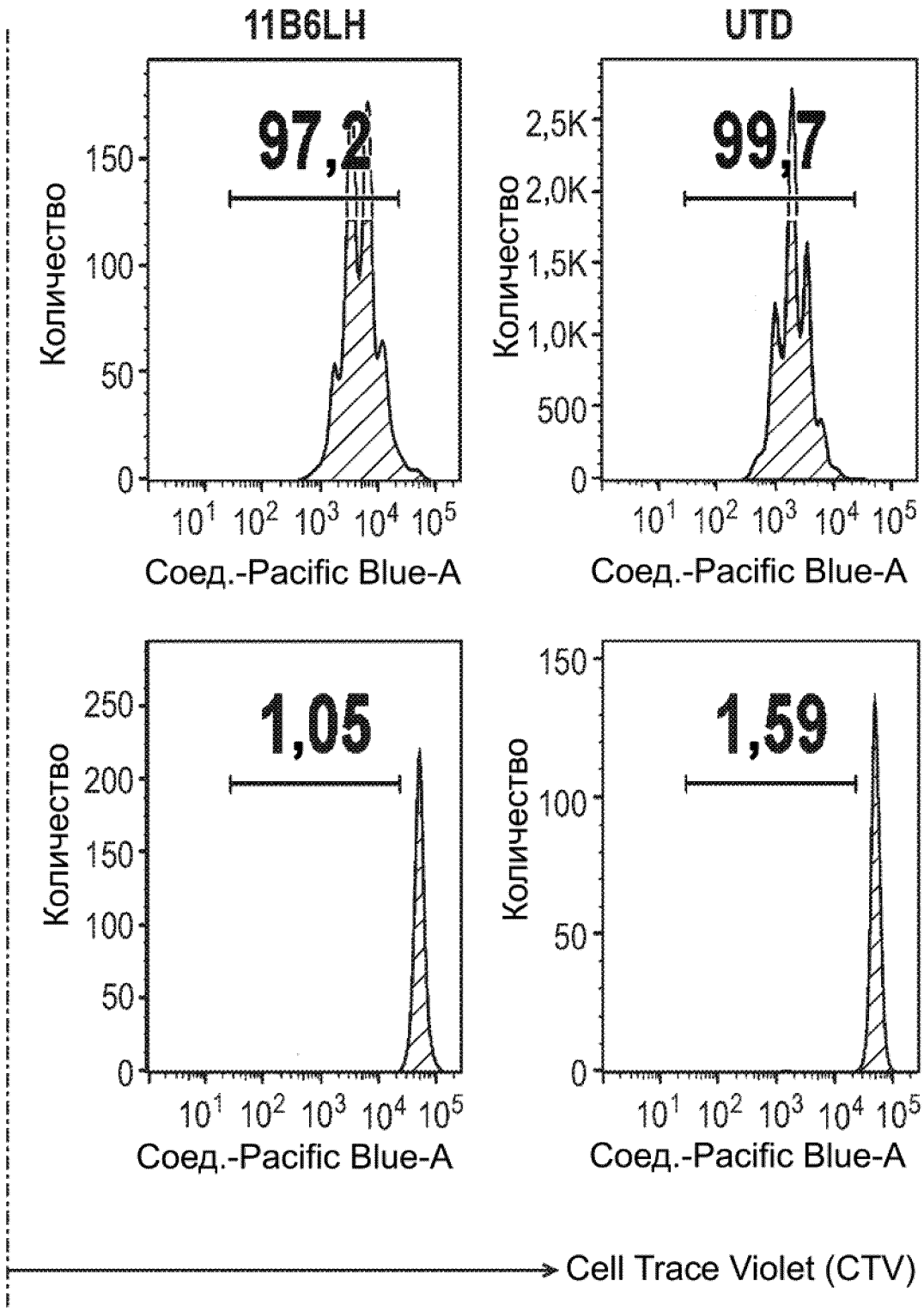
Фиг. 24B (продолж.)

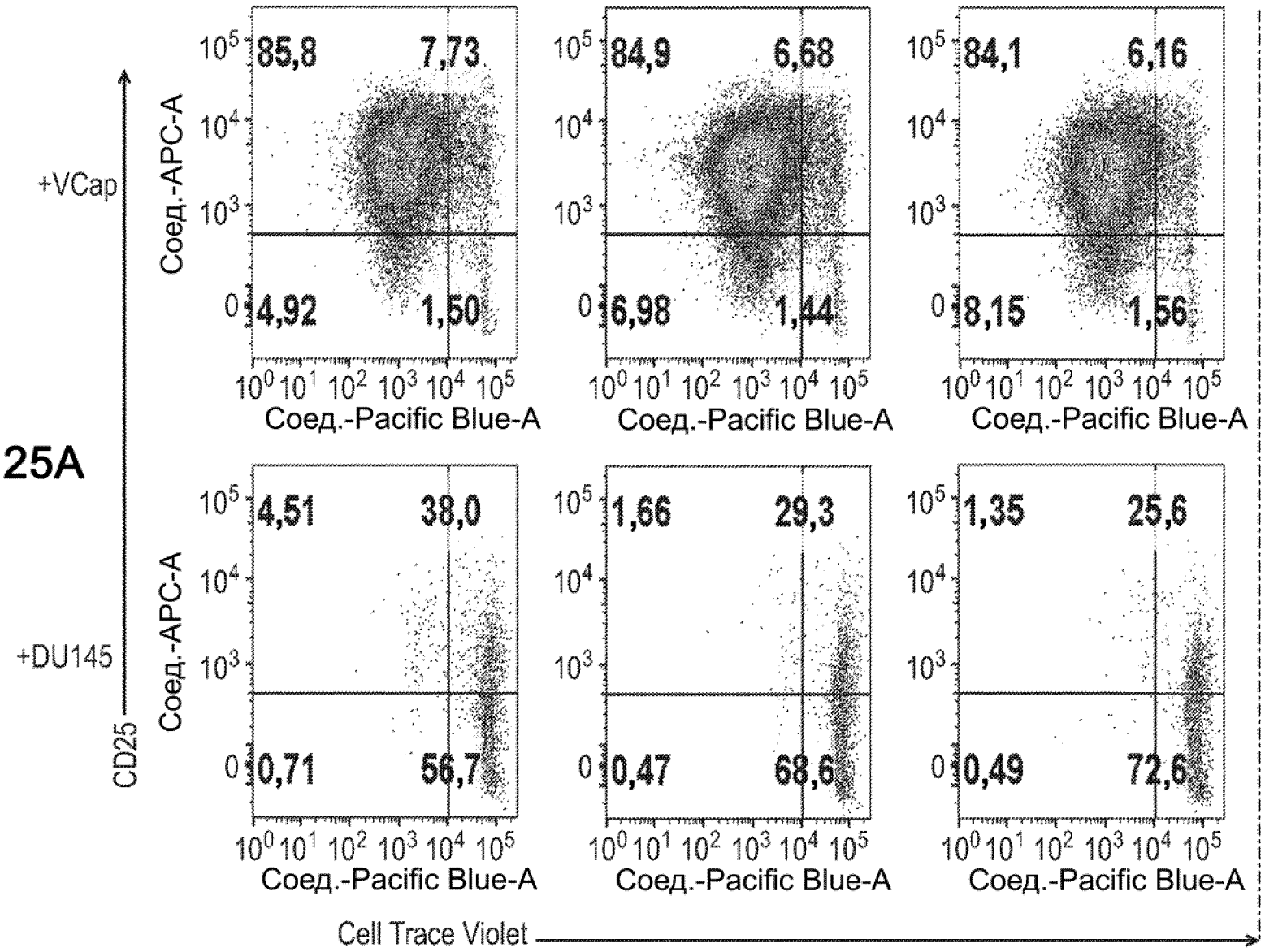


Фиг. 24B (продолж.)

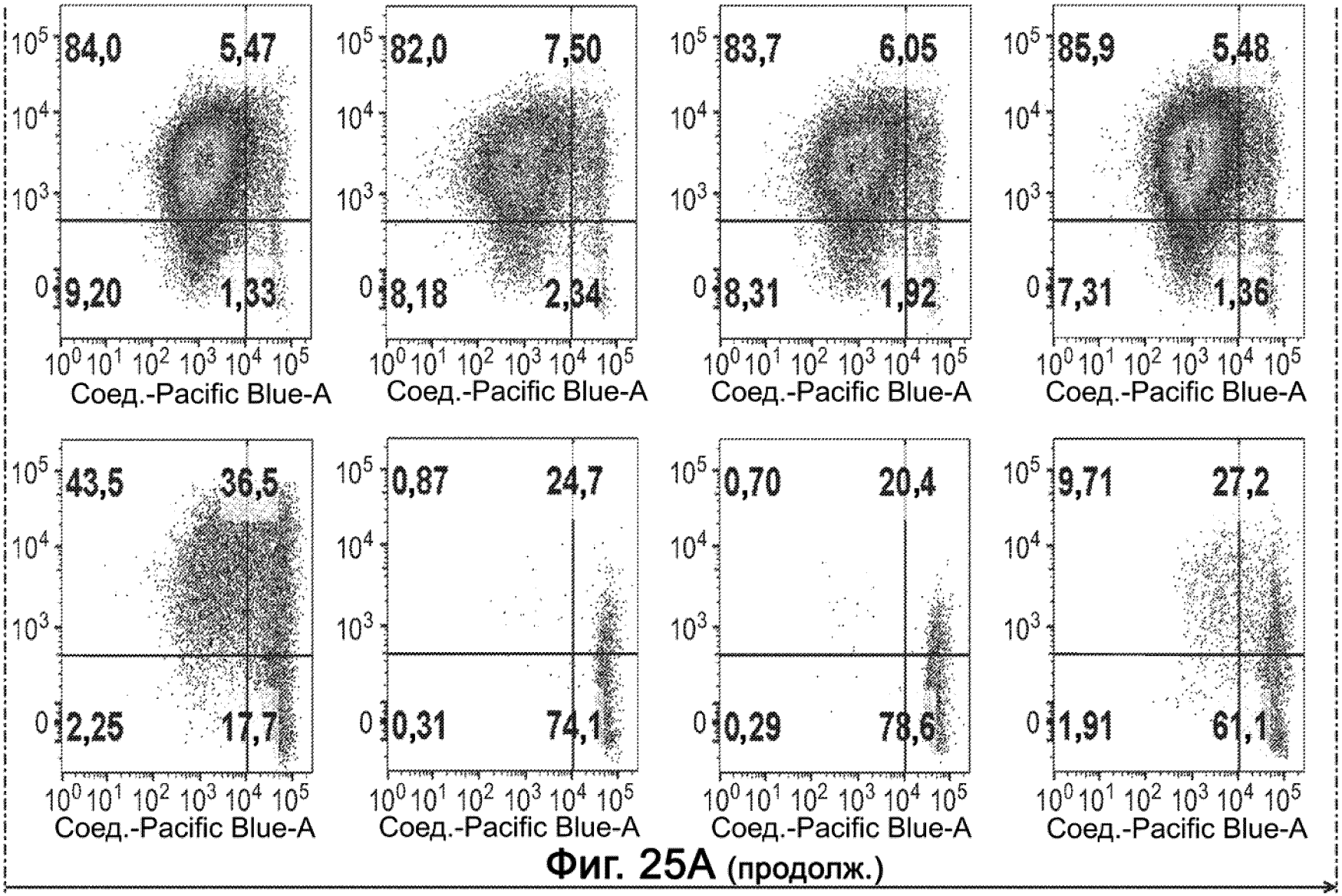


Фиг. 24B (продолж.)

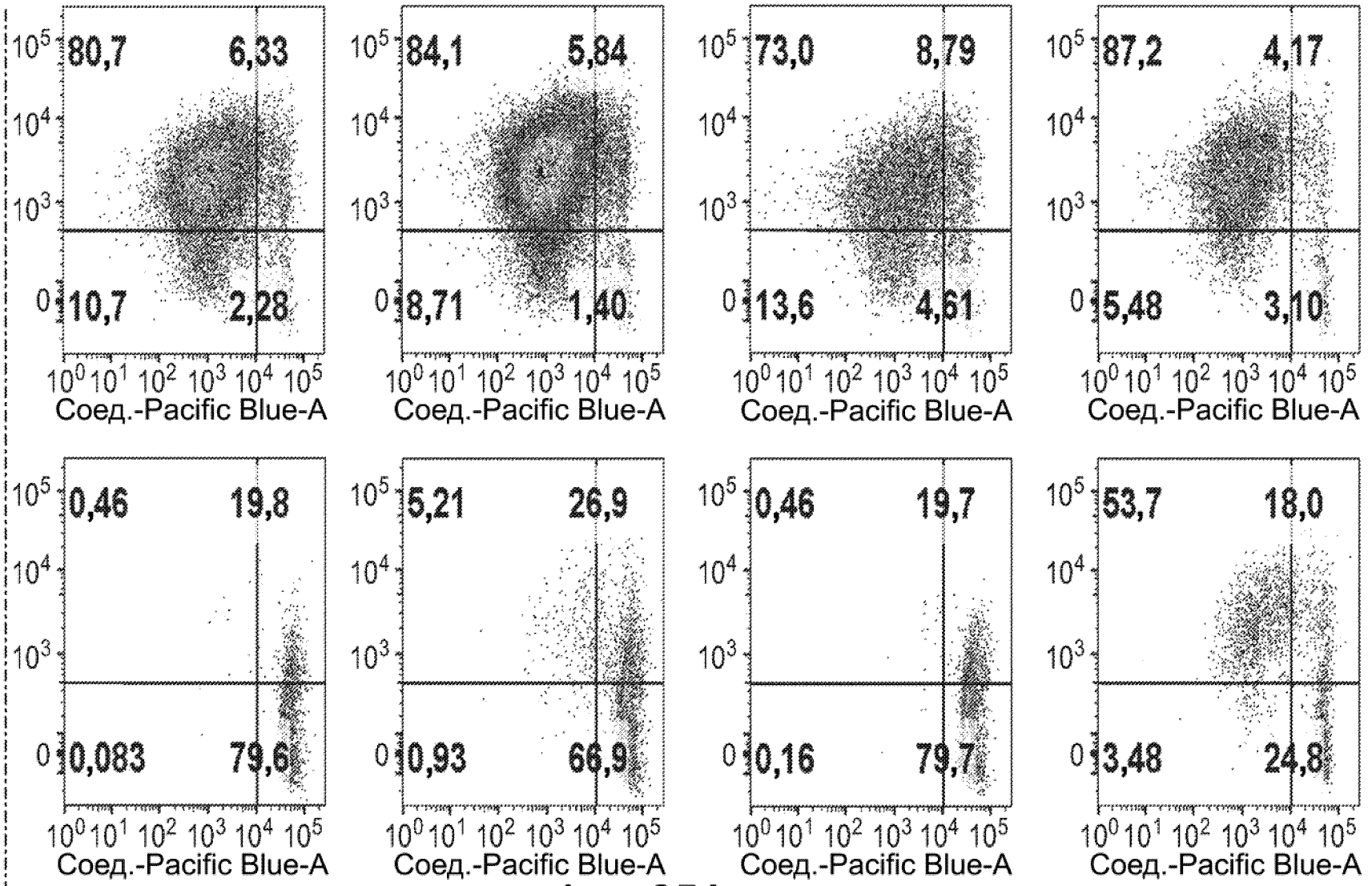



+VCap
+DU145
CD25
Соед.-APC-A
Соед.-Pacific Blue-A
Cell Trace Violet
85,8
7,73
4,92
1,50
84,9
6,68
6,98
1,44
84,1
6,16
8,15
1,56
4,51
38,0
0,71
56,7
1,66
29,3
0,47
68,6
1,35
25,6
0,49
72,6

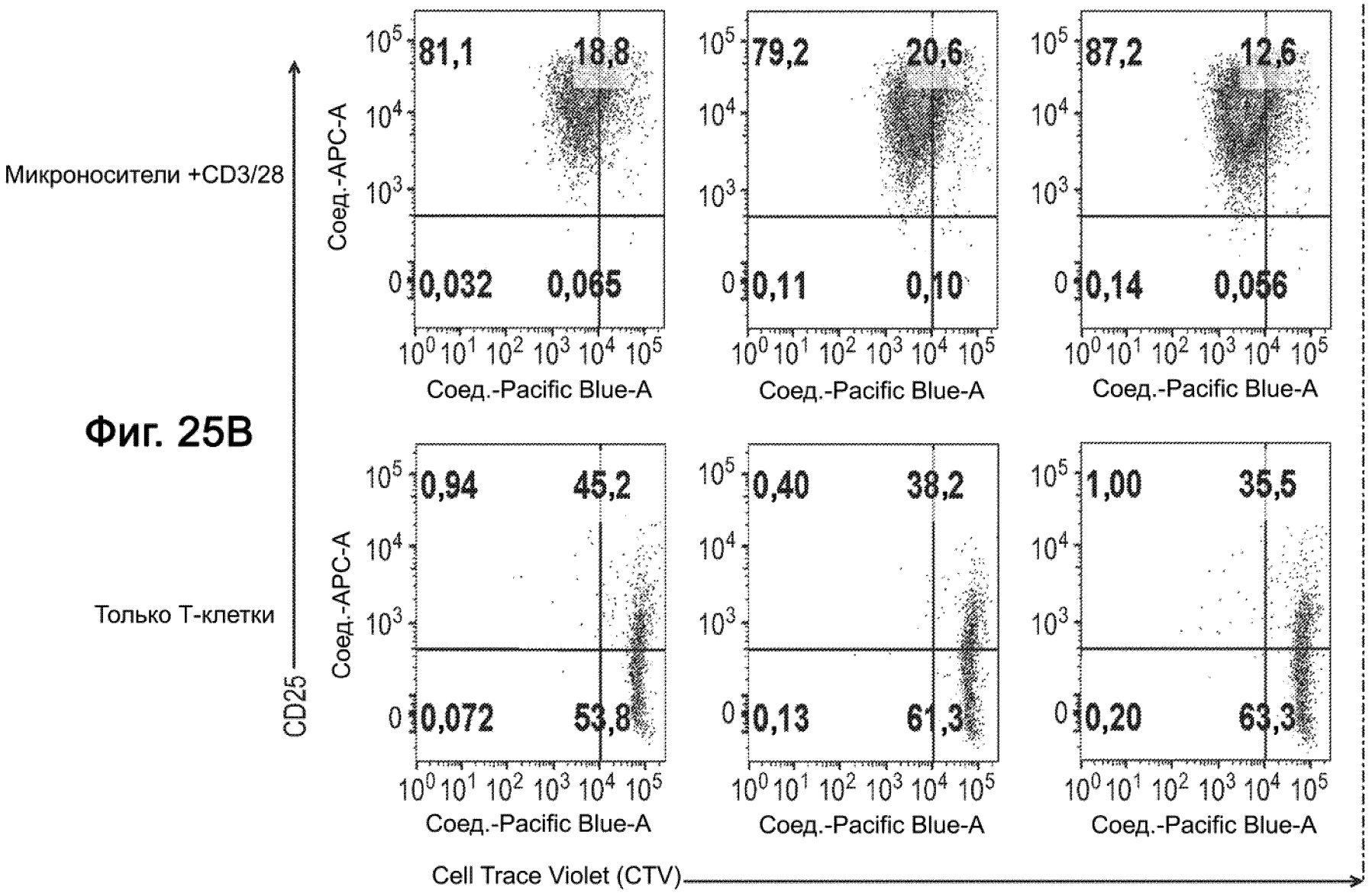
Фиг. 25A



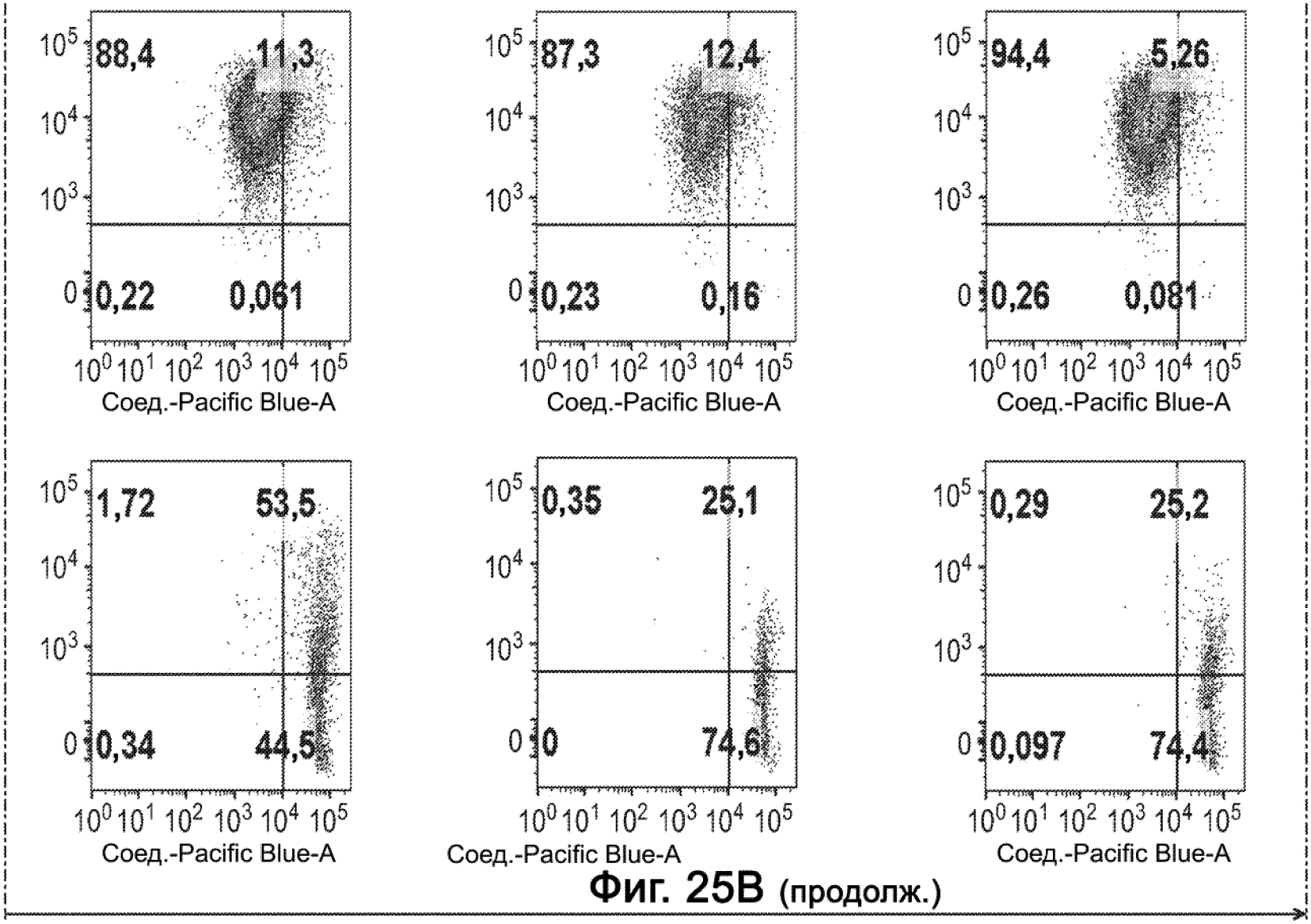
Фиг. 25A (продолж.)



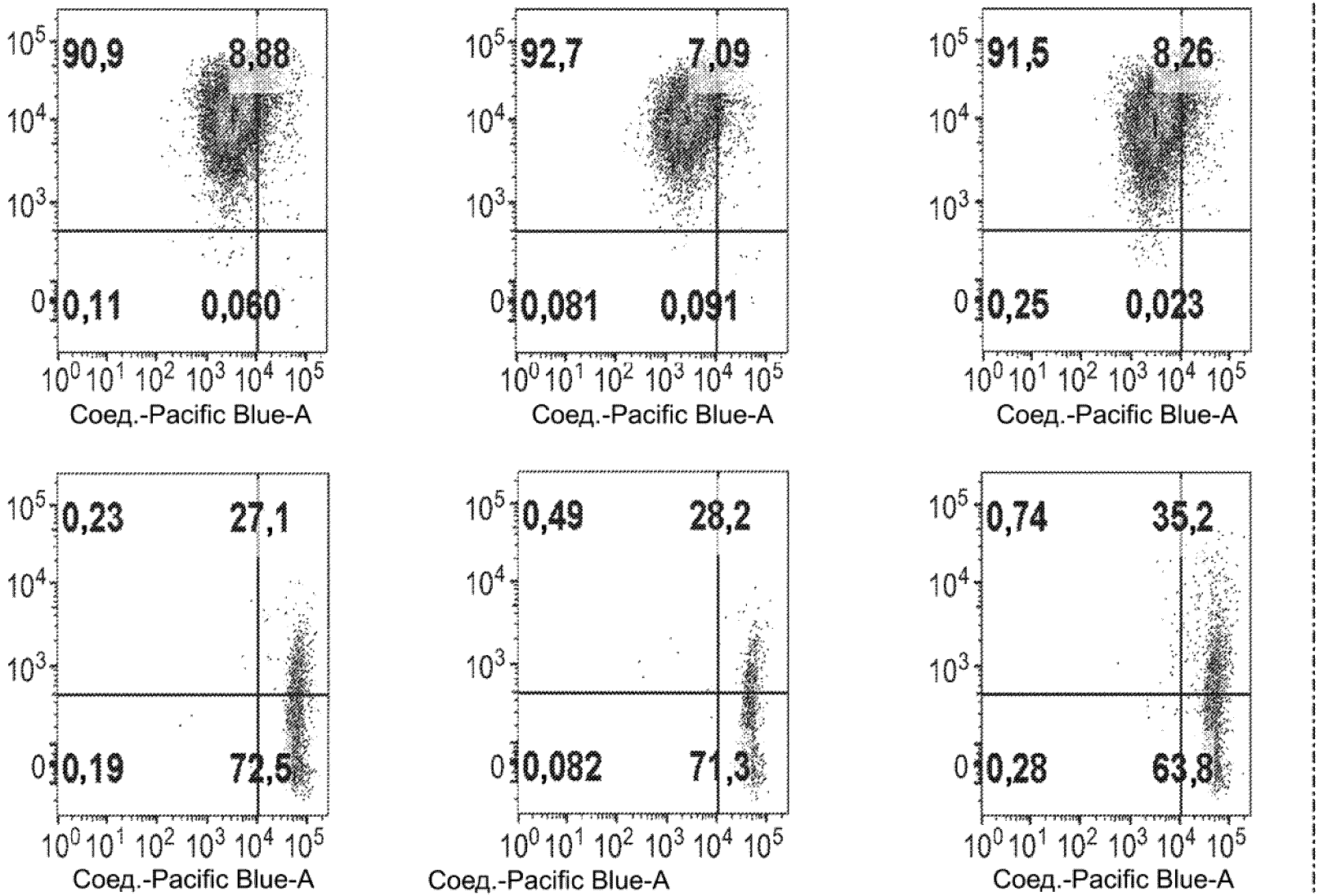
Фиг. 25A (продолж.)


Микроносители +CD3/28
Только Т-клетки
CD25
Соед.-APC-A
Соед.-Pacific Blue-A
Cell Trace Violet (CTV)
81,1
18,8
0,032
0,065
79,2
20,6
0,11
0,10
87,2
12,6
0,14
0,056
0,94
45,2
0,072
53,8
0,40
38,2
0,13
61,3
1,00
35,5
0,20
63,3

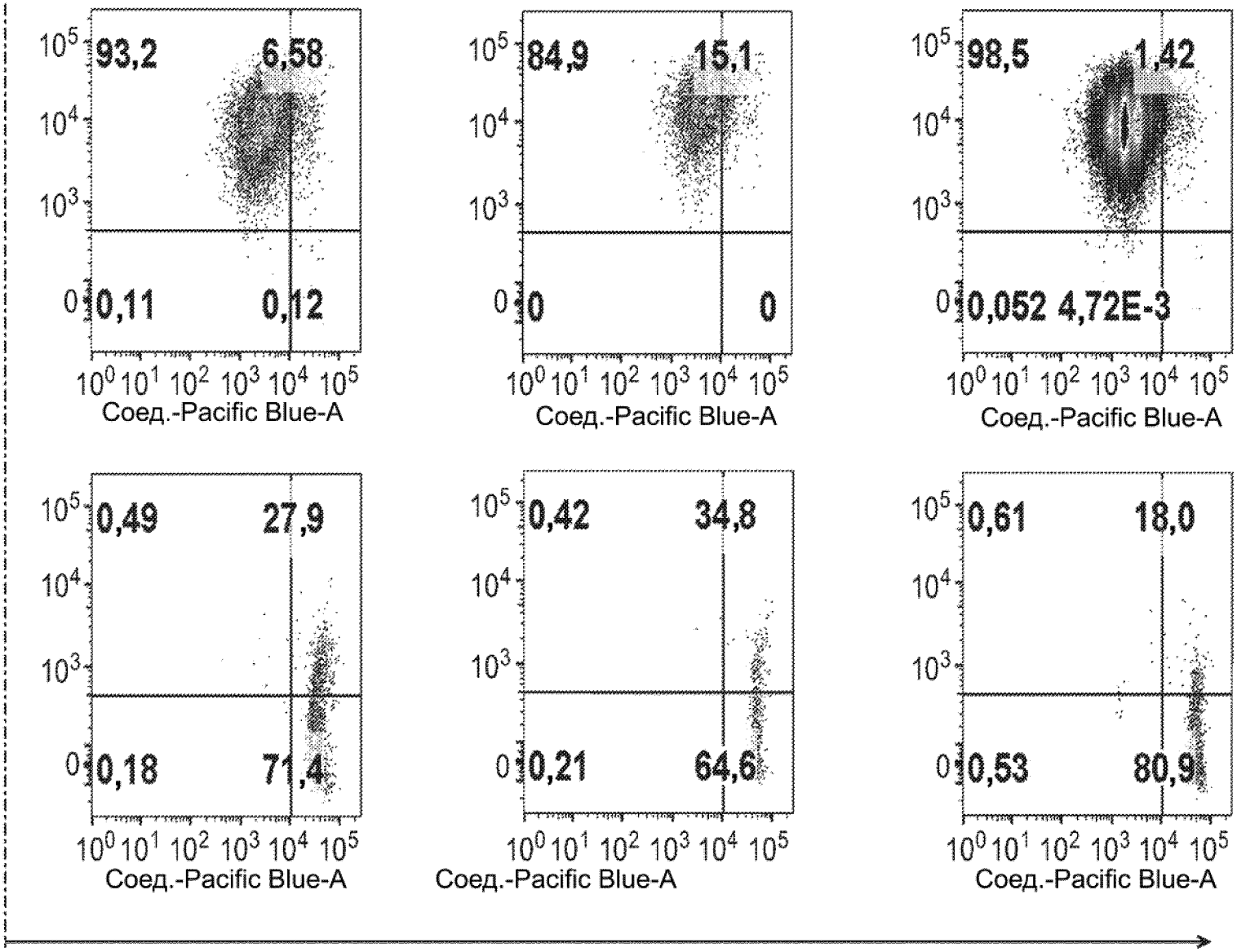
Фиг. 25B



Фиг. 25B (продолж.)

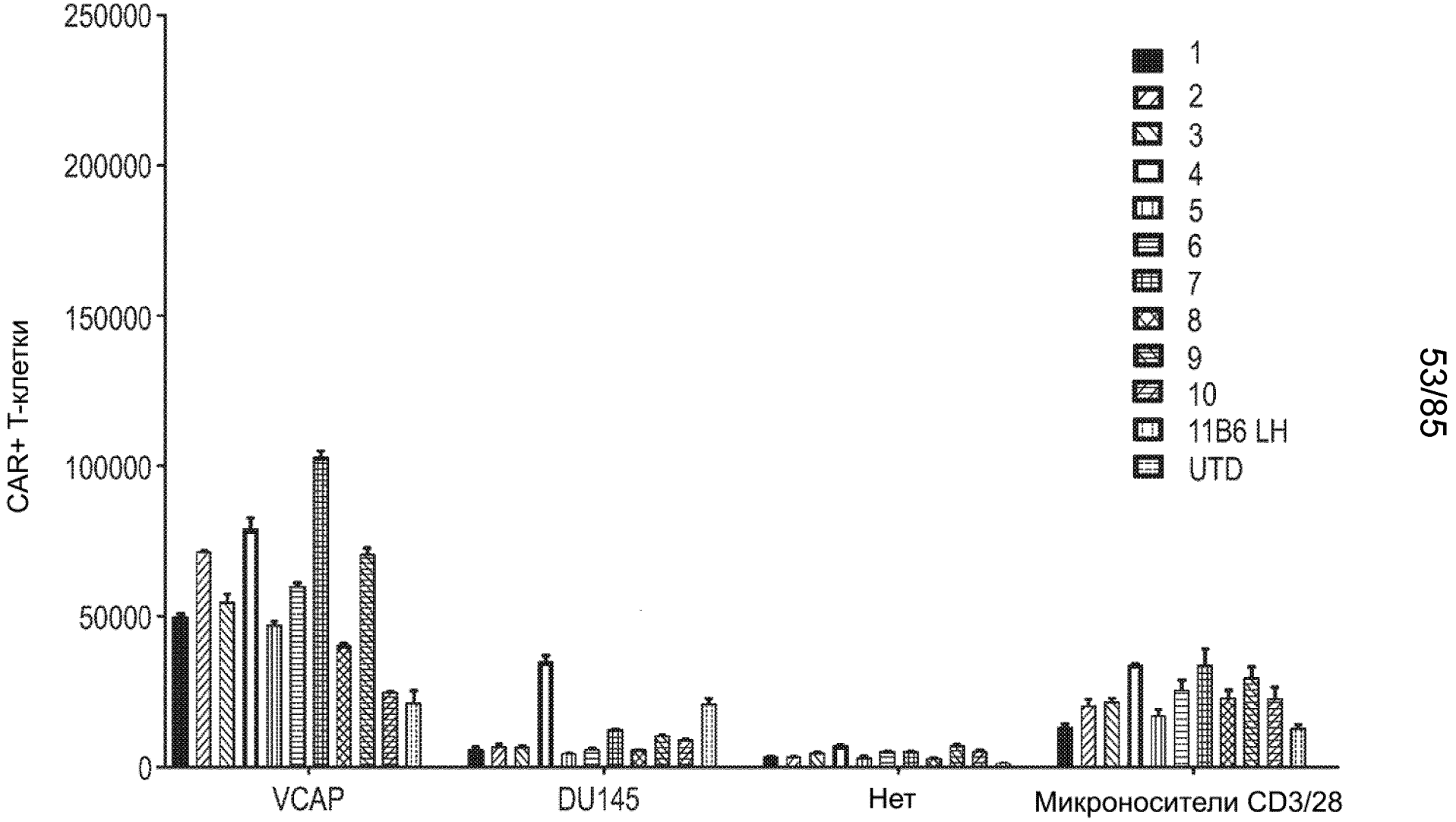


Фиг. 25B (продолж.)

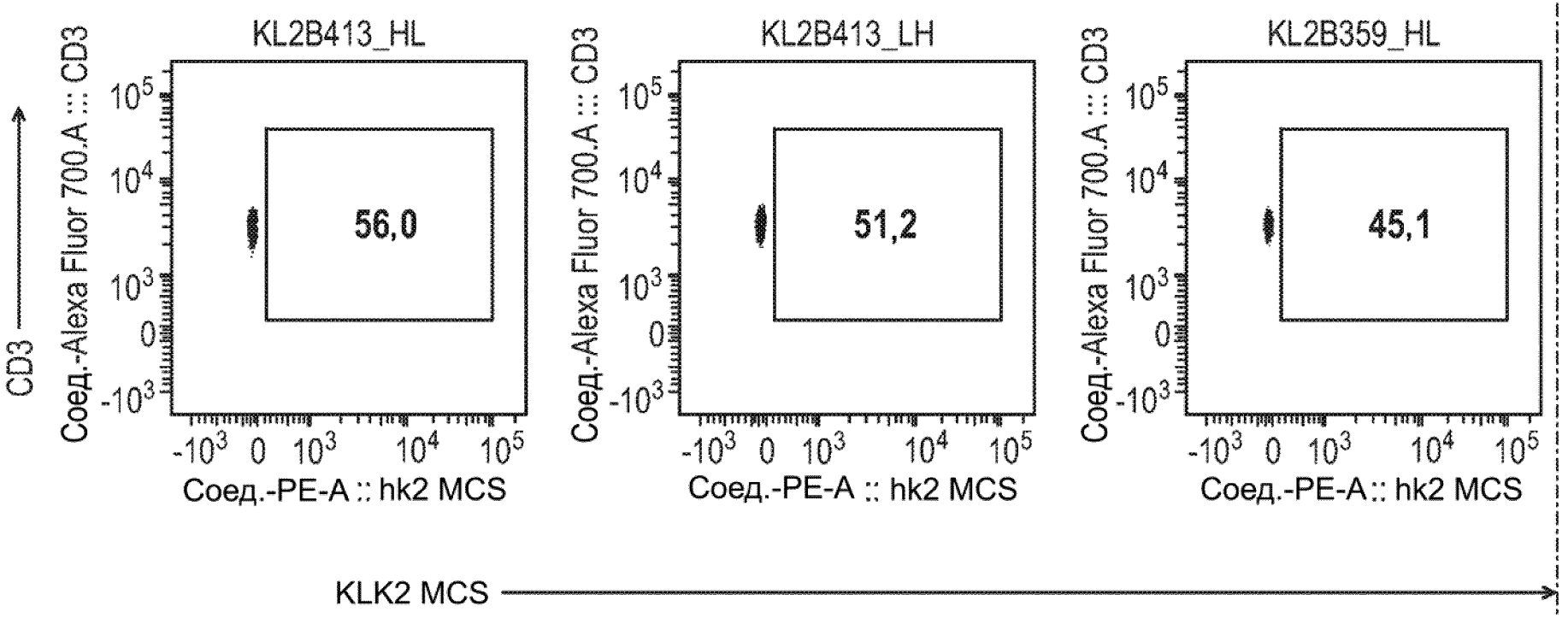


Фиг. 25B
(продолж.)

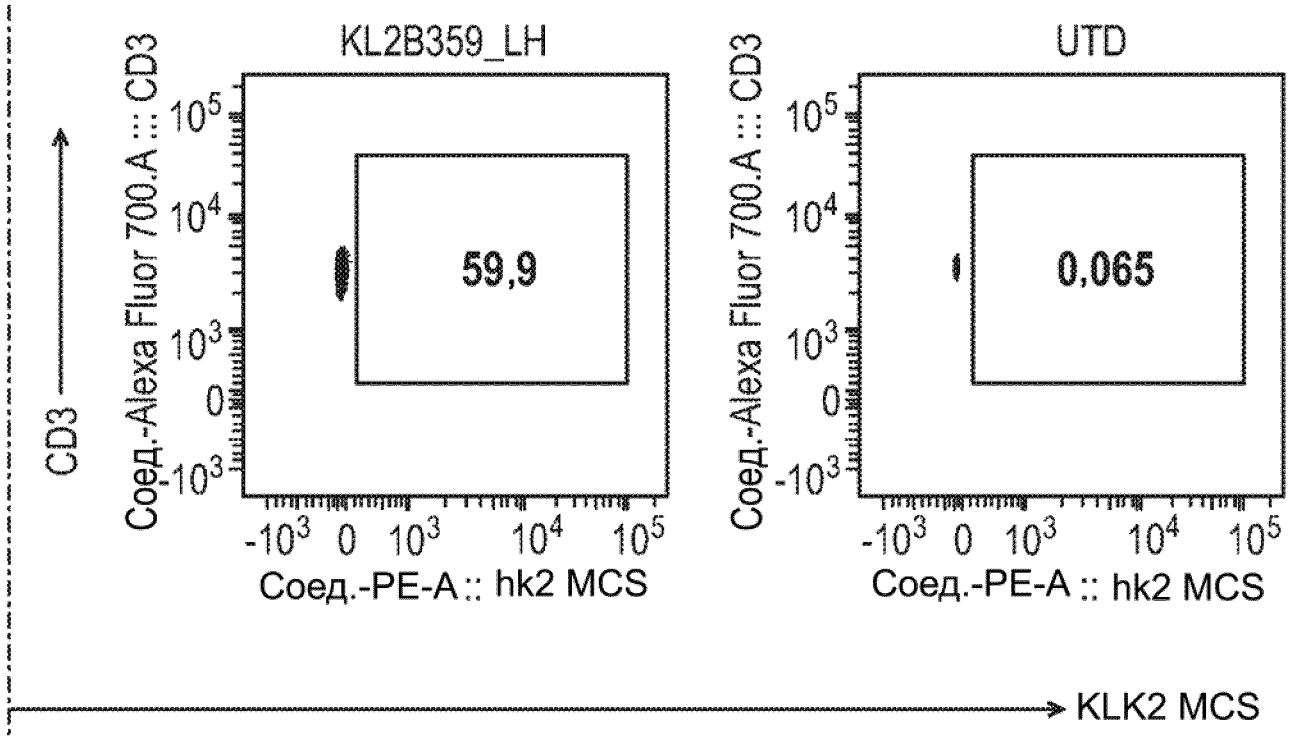
Фиг. 26


250000
200000
150000
100000
50000
0
CAR+ Т-клетки
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11B6 LH
UTD
VCAP
DU145
Нет
Микроносители CD3/28

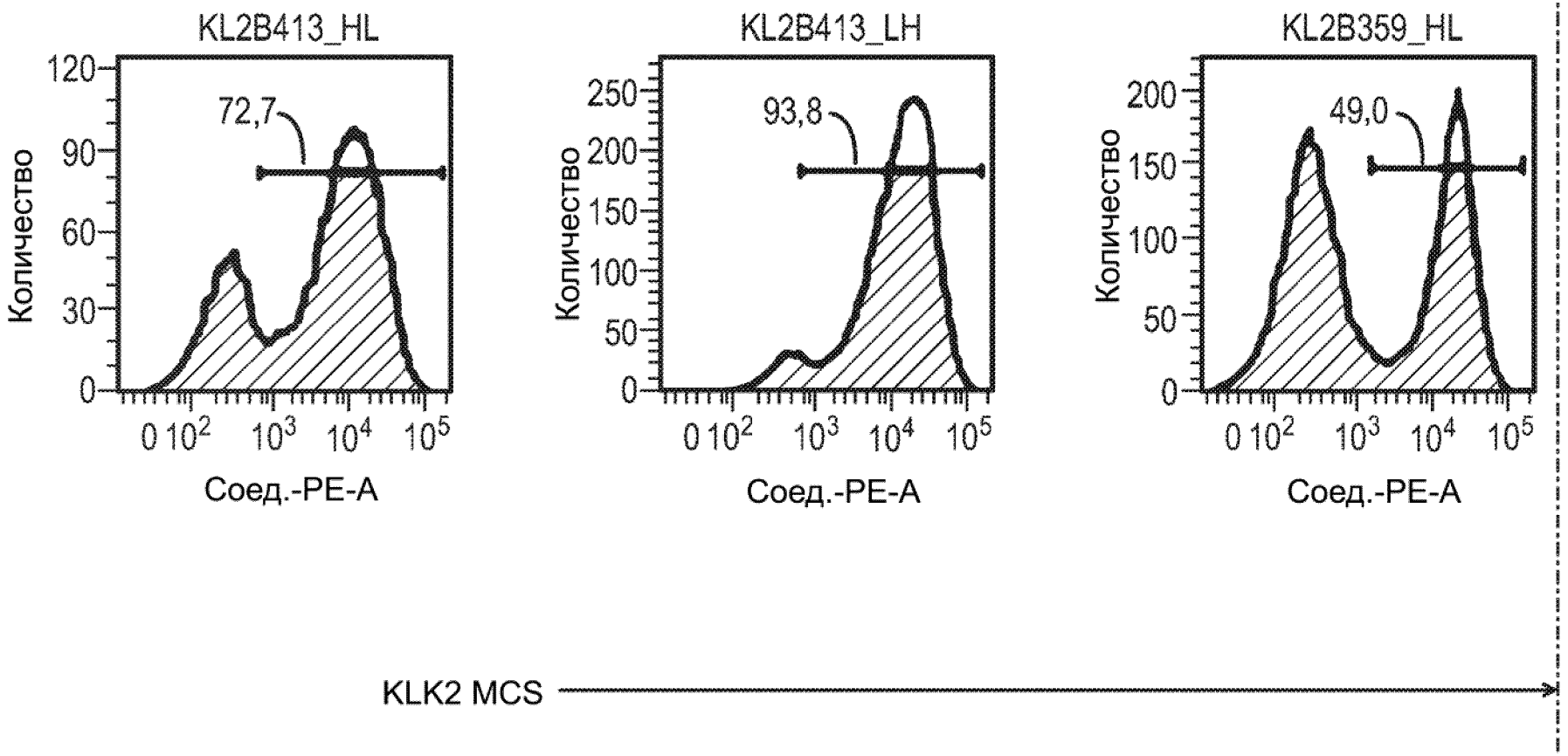
Фиг. 27


KL2B413_HL
KL2B413_LH
KL2B359_HL
56,0
51,2
45,1
Соед.-Alexa Fluor 700.A ::: CD3
Соед.-PE-A :: hk2 MCS
CD3
KLK2 MCS

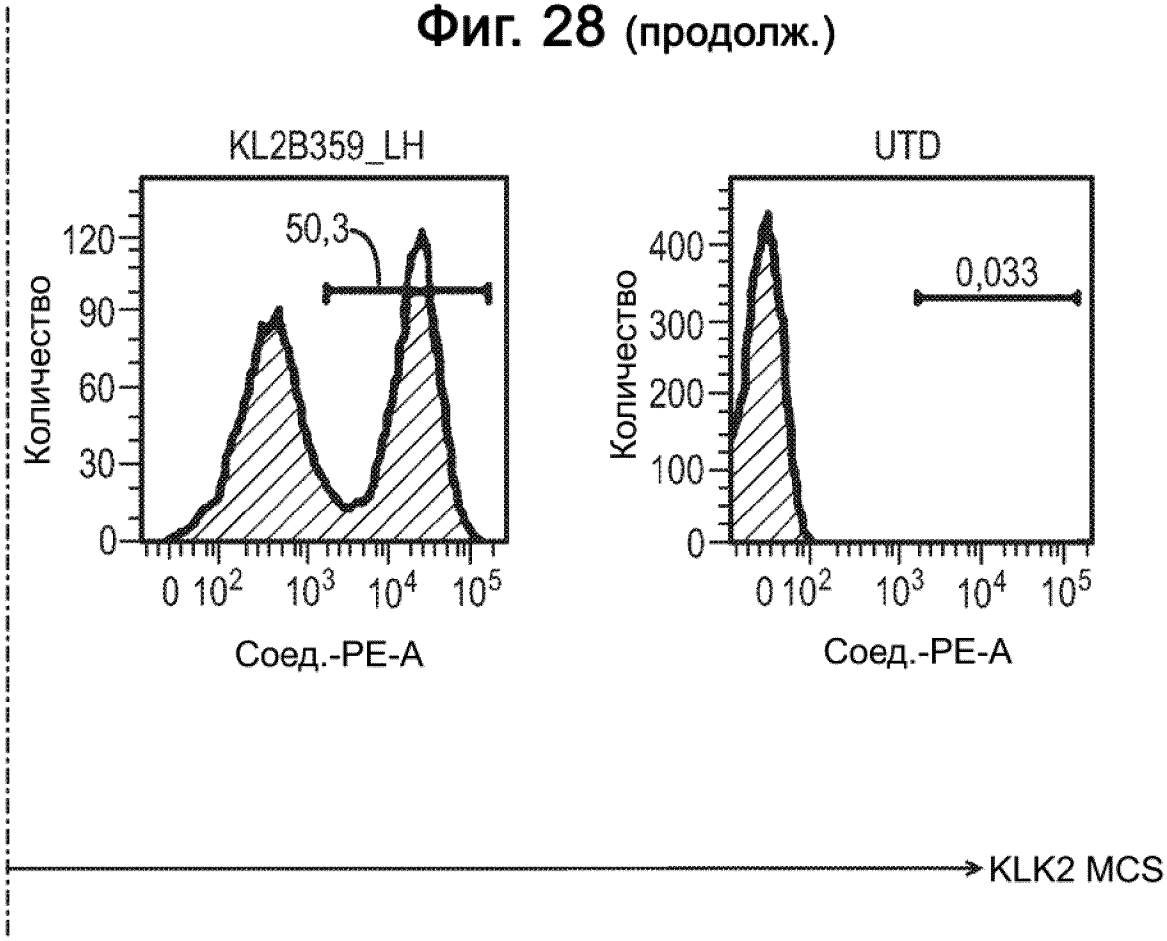
Фиг. 27 (продолж.)



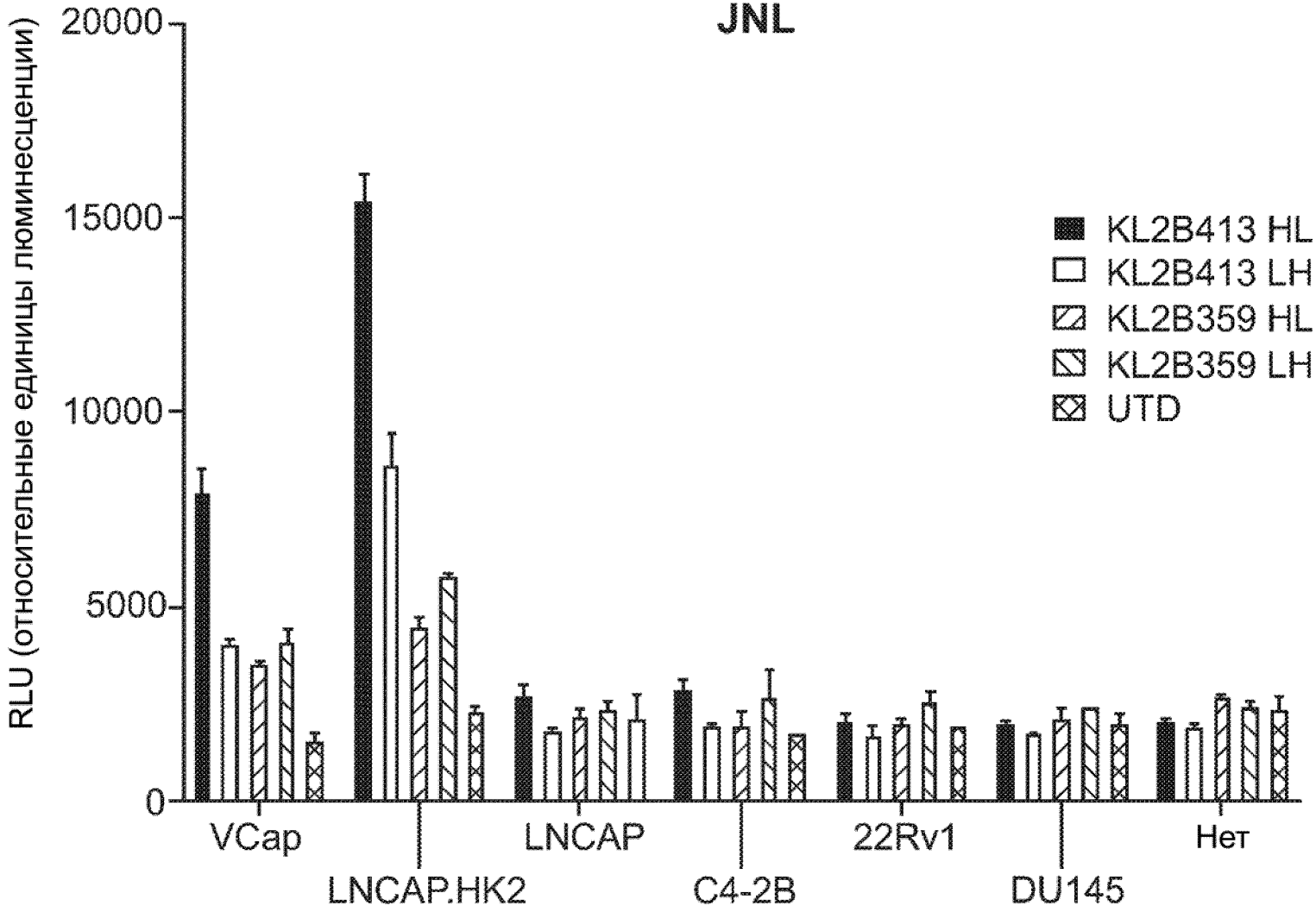
Фиг. 28


KL2B413_HL
72,7
Количество
120
90
60
30
0
0 10^2 10^3 10^4 10^5
Соед.-PE-A
KL2B413_LH
93,8
Количество
250
200
150
100
50
0
0 10^2 10^3 10^4 10^5
Соед.-PE-A
KL2B359_HL
49,0
Количество
200
150
100
50
0
0 10^2 10^3 10^4 10^5
Соед.-PE-A
KLK2 MCS

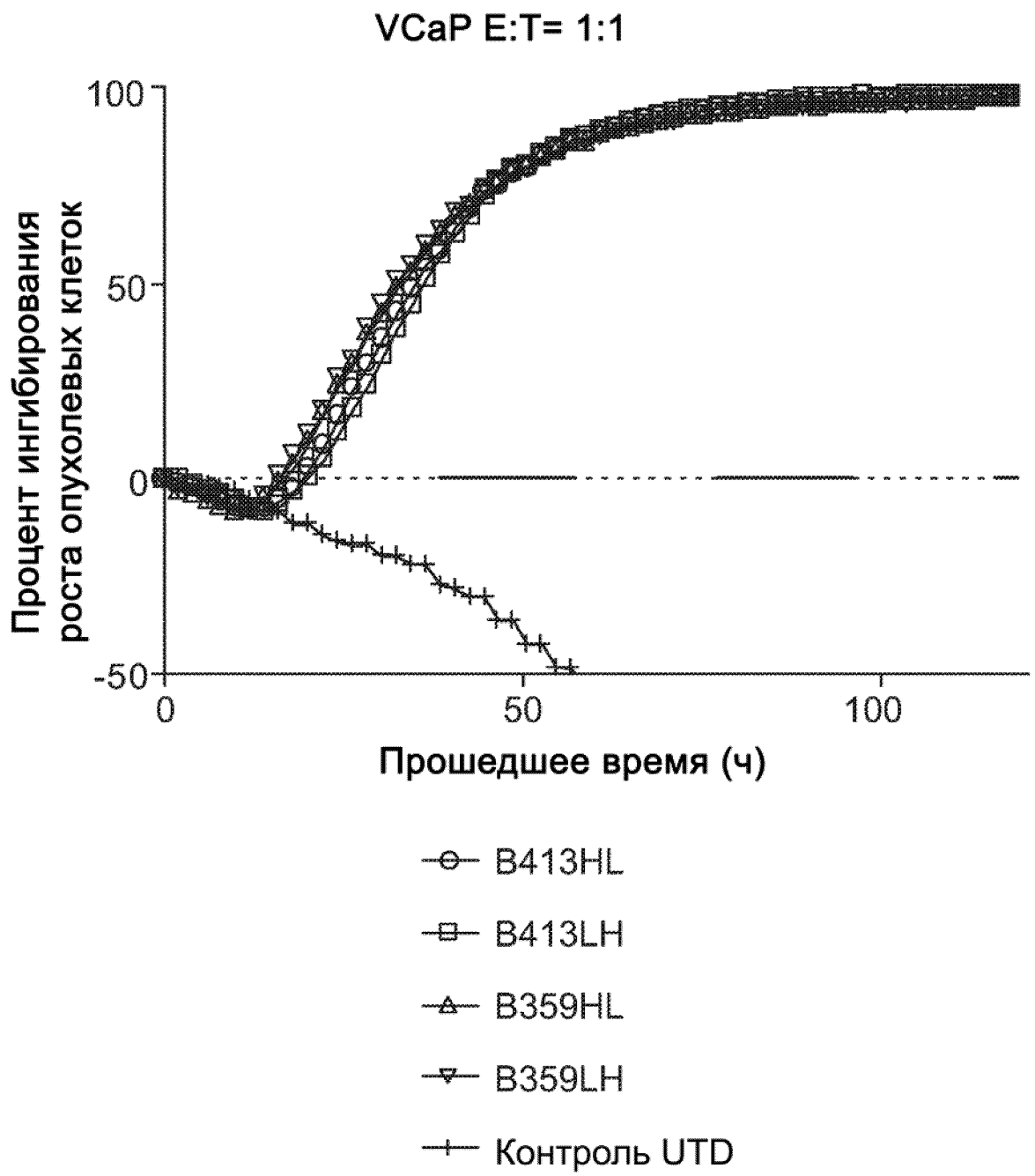
Фиг. 28 (продолж.)



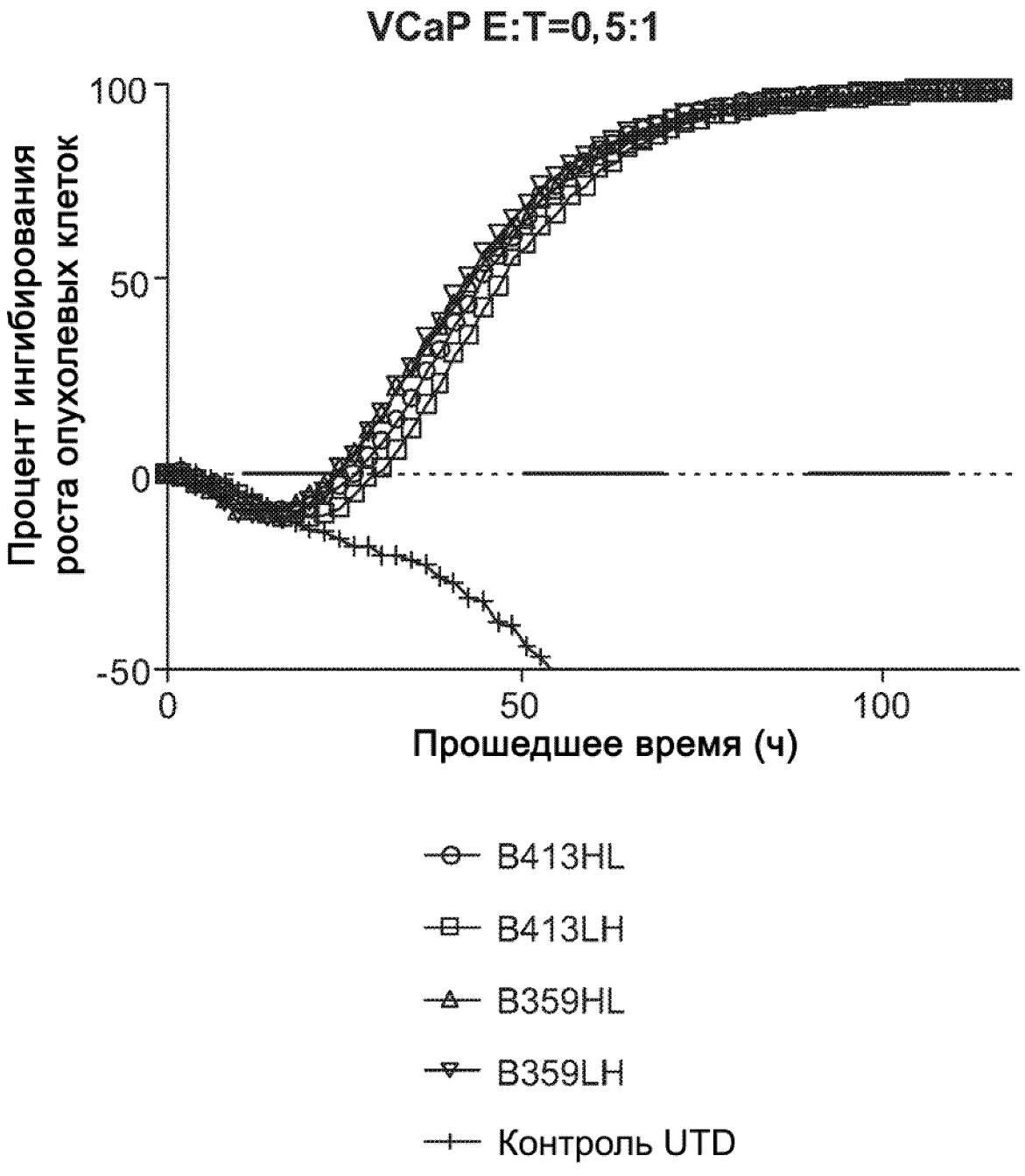
Фиг. 29


JNL
RLU (относительные единицы люминесценции)
20000
15000
10000
5000
0
KL2B413 HL
KL2B413 LH
KL2B359 HL
KL2B359 LH
UTD
VCap
LNCAP.HK2
LNCAP
C4-2B
22Rv1
DU145
Нет

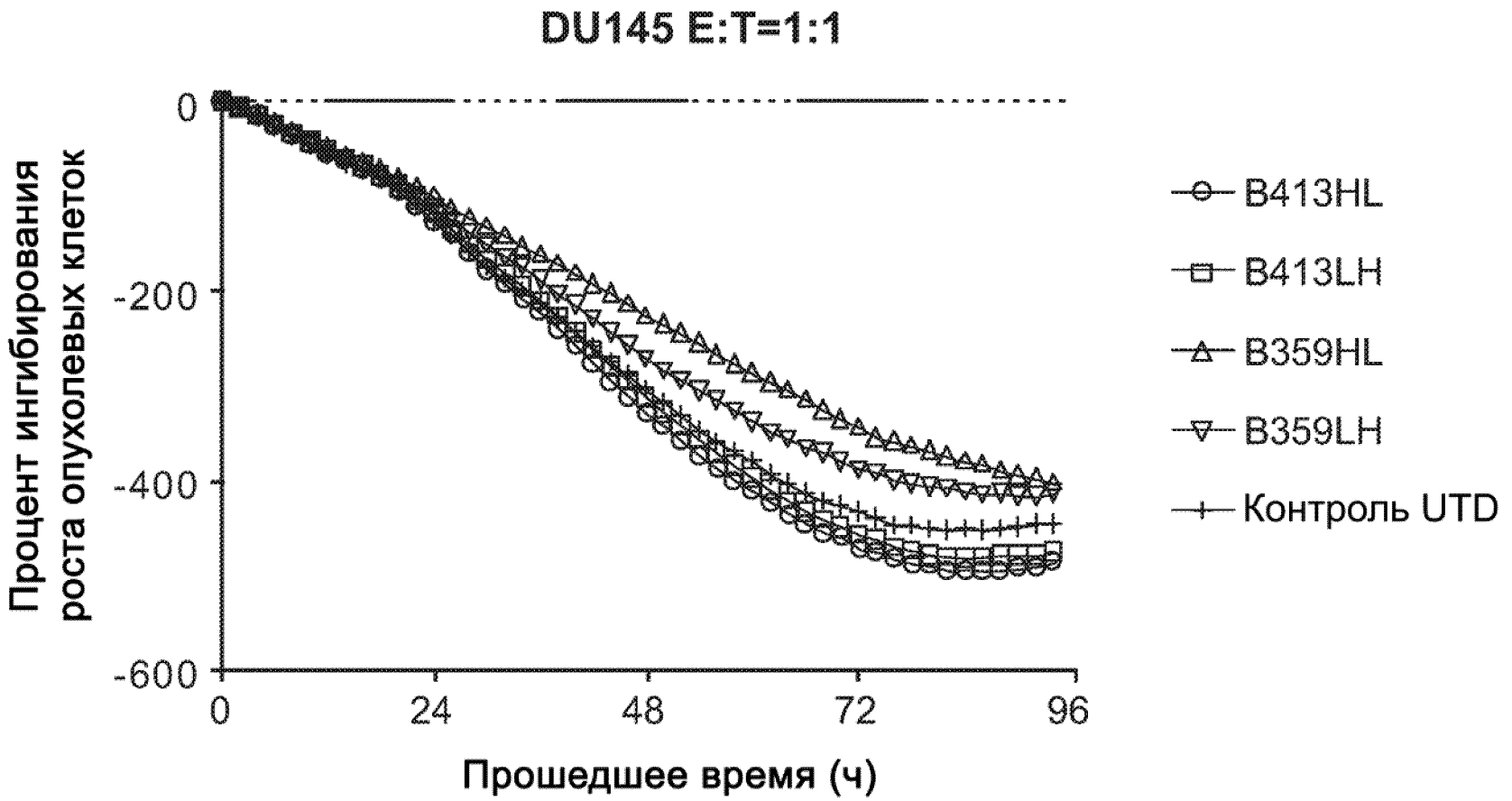
Фиг. 30


VCaP E:T= 1:1
Процент ингибирования роста опухолевых клеток
100
50
0
-50
0
50
100
Прошедшее время (ч)
B413HL
B413LH
B359HL
B359LH
Контроль UTD

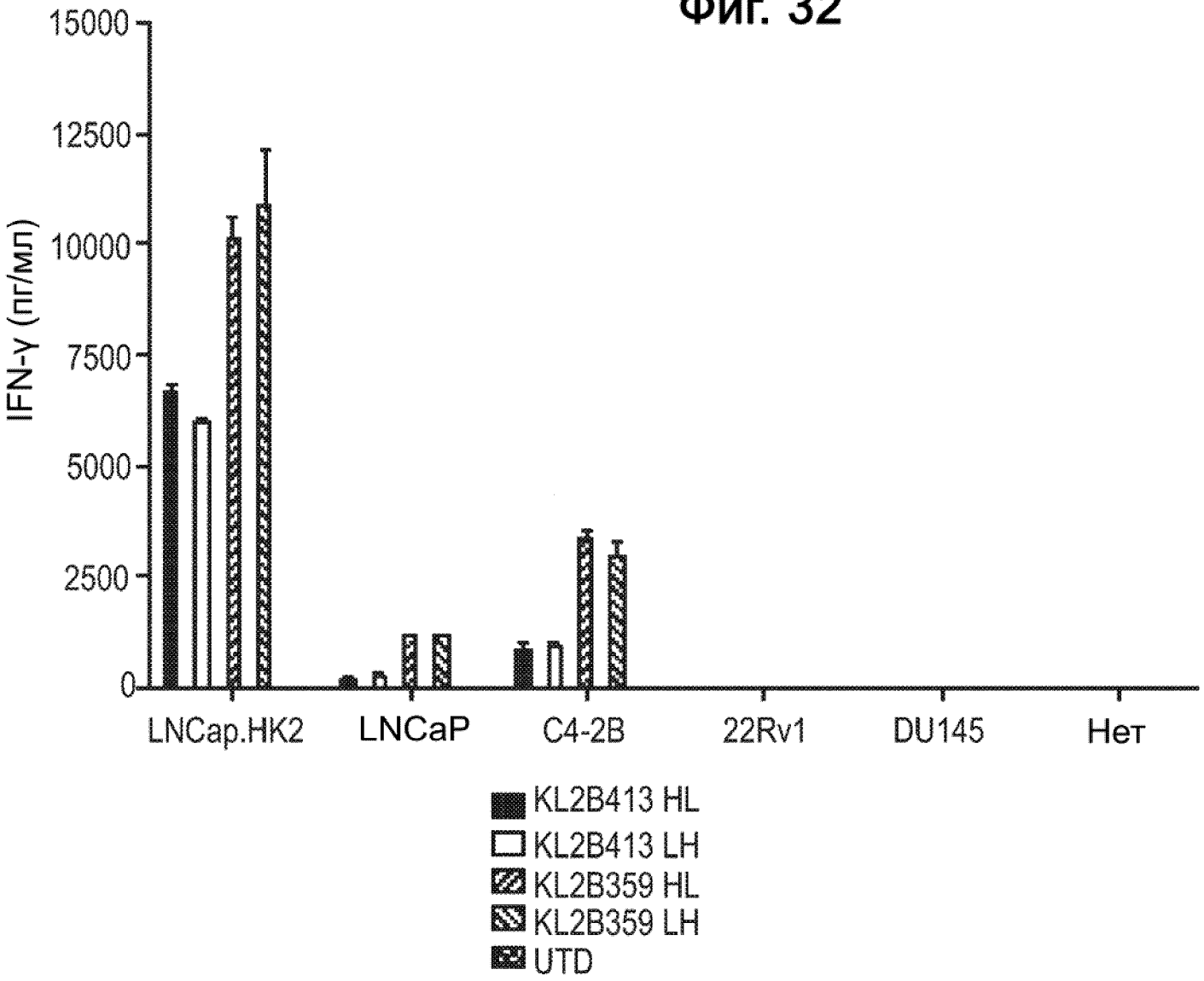
Фиг. 30 (продолж.)



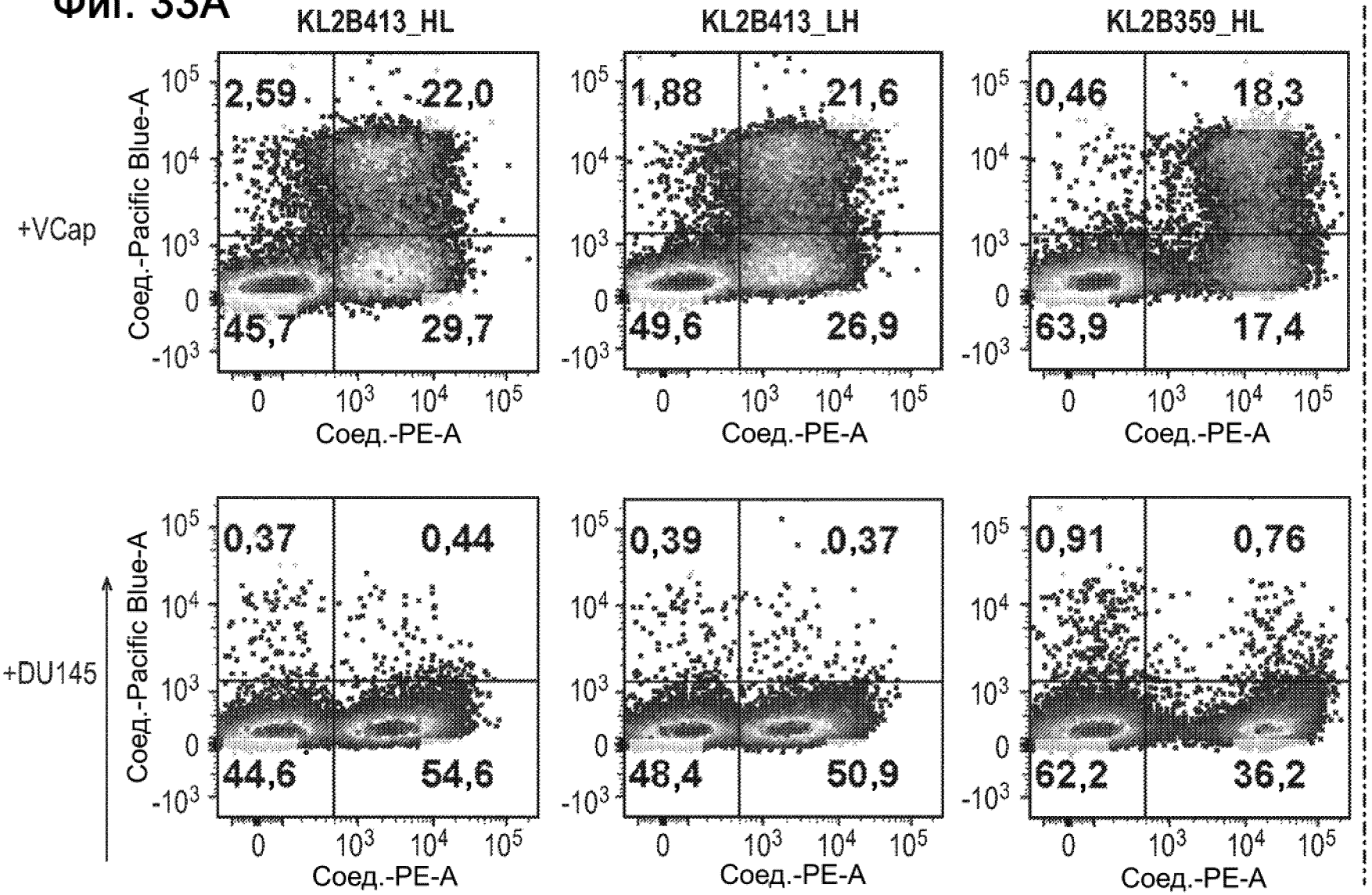
Фиг. 31

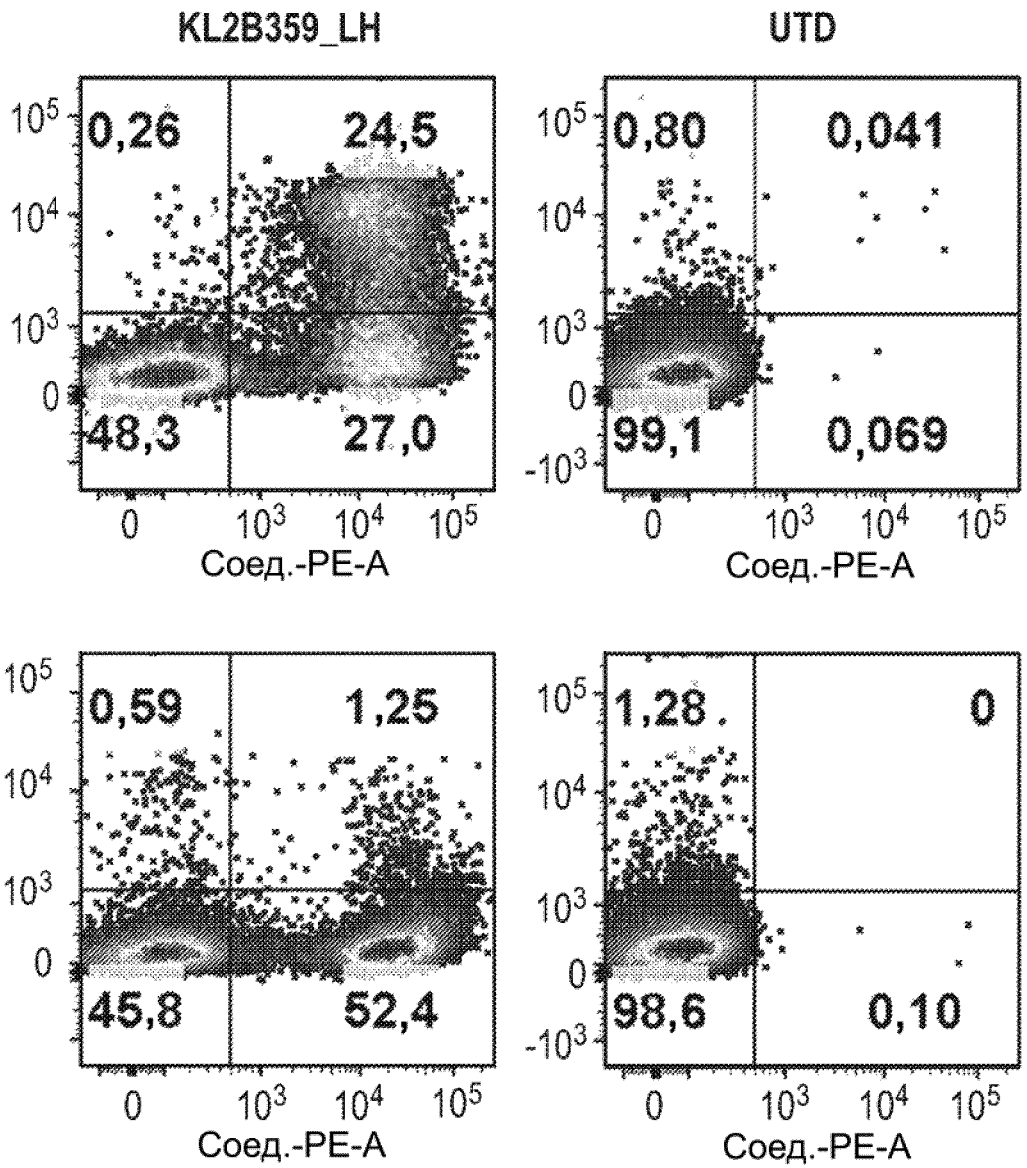

DU145 E:T=1:1
Процент ингибирования роста опухолевых клеток
0
-200
-400
-600
0
24
48
72
96
Прошедшее время (ч)
B413HL
B413LH
B359HL
B359LH
Контроль UTD

Фиг. 32


15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
IFN-γ (пг/мл)
LNCap.HK2
LNCaP
C4-2B
22Rv1
DU145
Нет
KL2B413 HL
KL2B413 LH
KL2B359 HL
KL2B359 LH
UTD

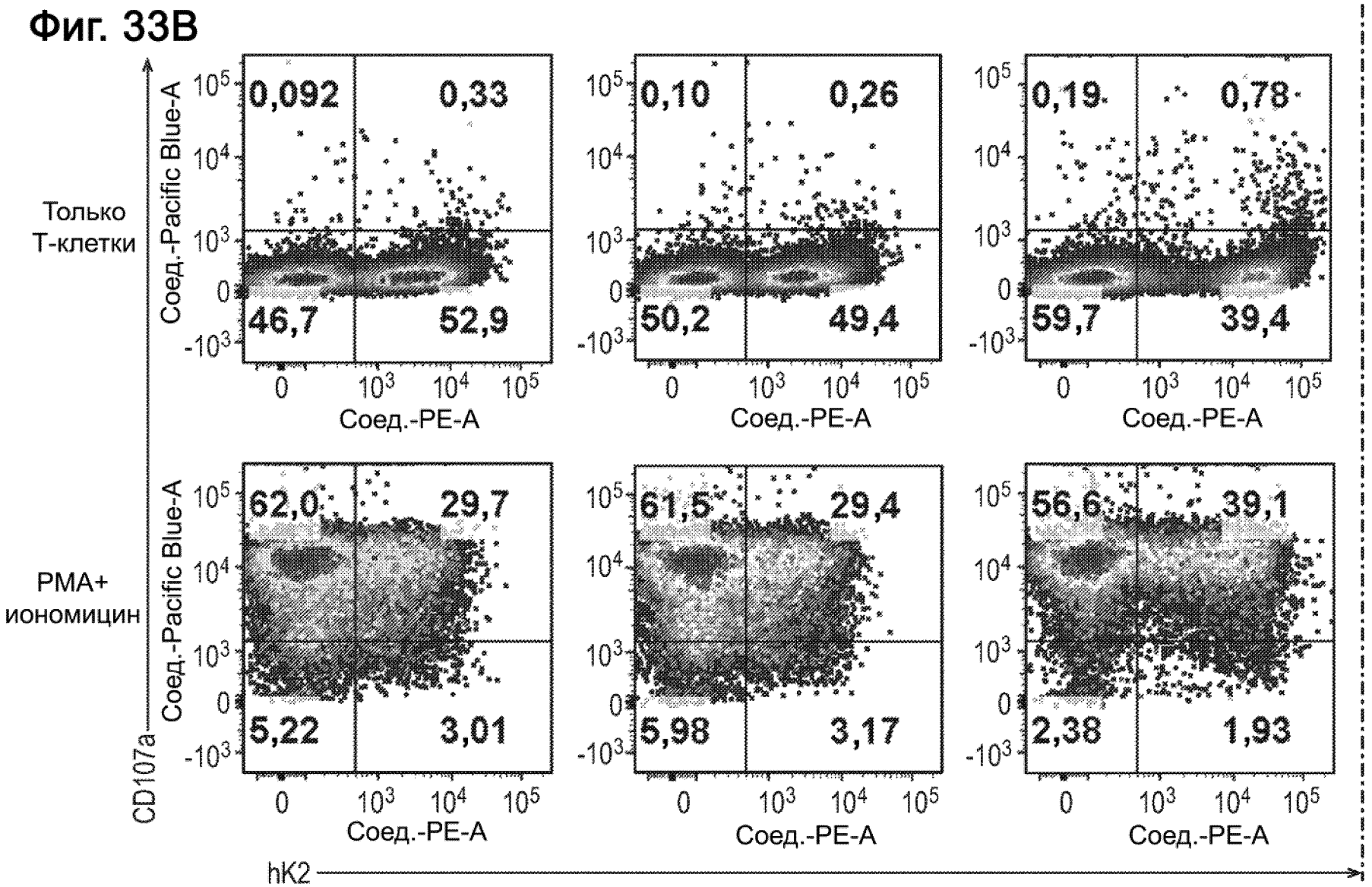
Фиг. 33A

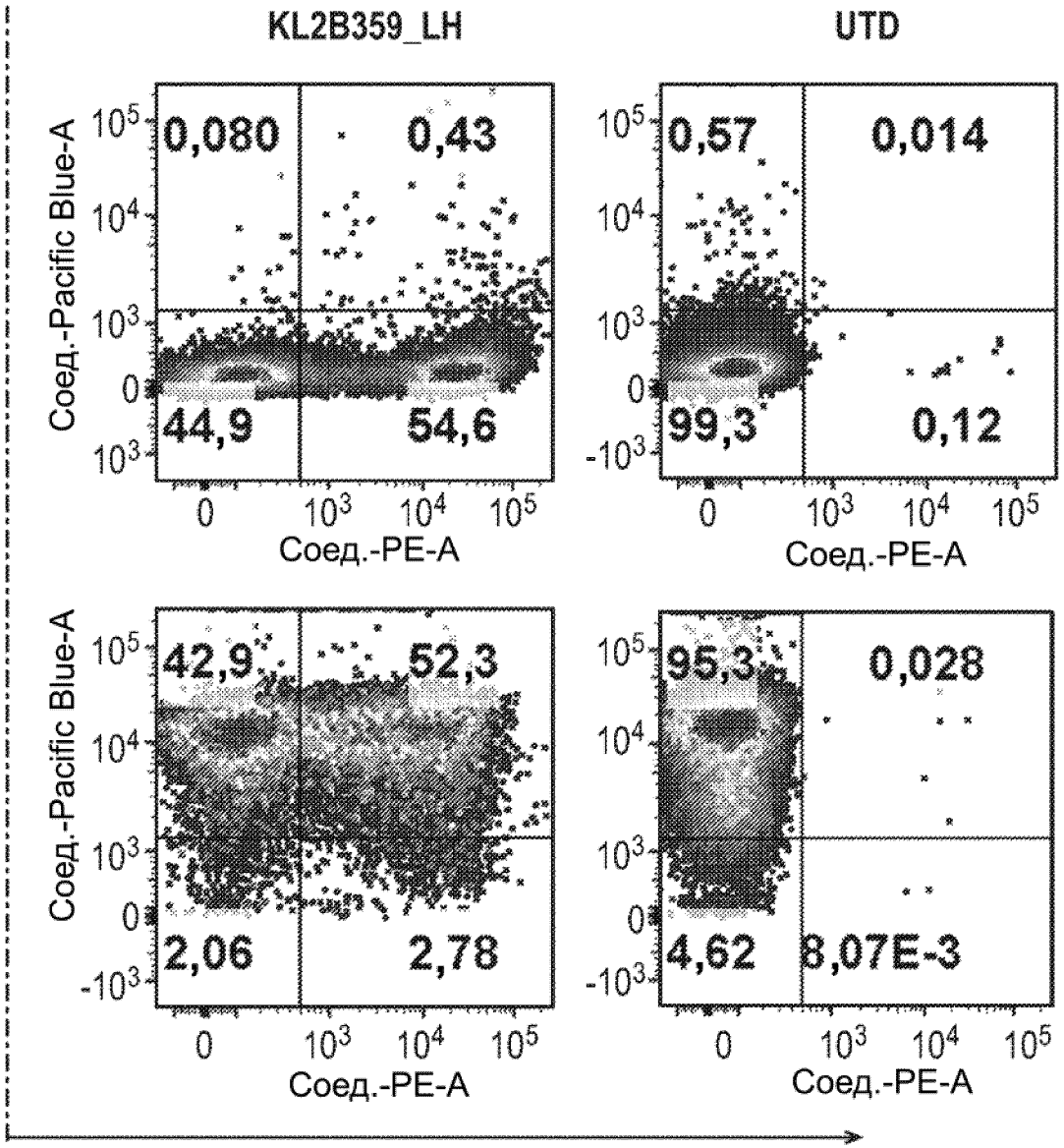

KL2B413_HL
KL2B413_LH
KL2B359_HL
+VCap
+DU145
Соед.-Pacific Blue-A
Соед.-PE-A
2,59
22,0
45,7
29,7
1,88
21,6
49,6
26,9
0,46
18,3
63,9
17,4
0,37
0,44
44,6
54,6
0,39
0,37
48,4
50,9
0,91
0,76
62,2
36,2



Фиг. 33A (продолж.)

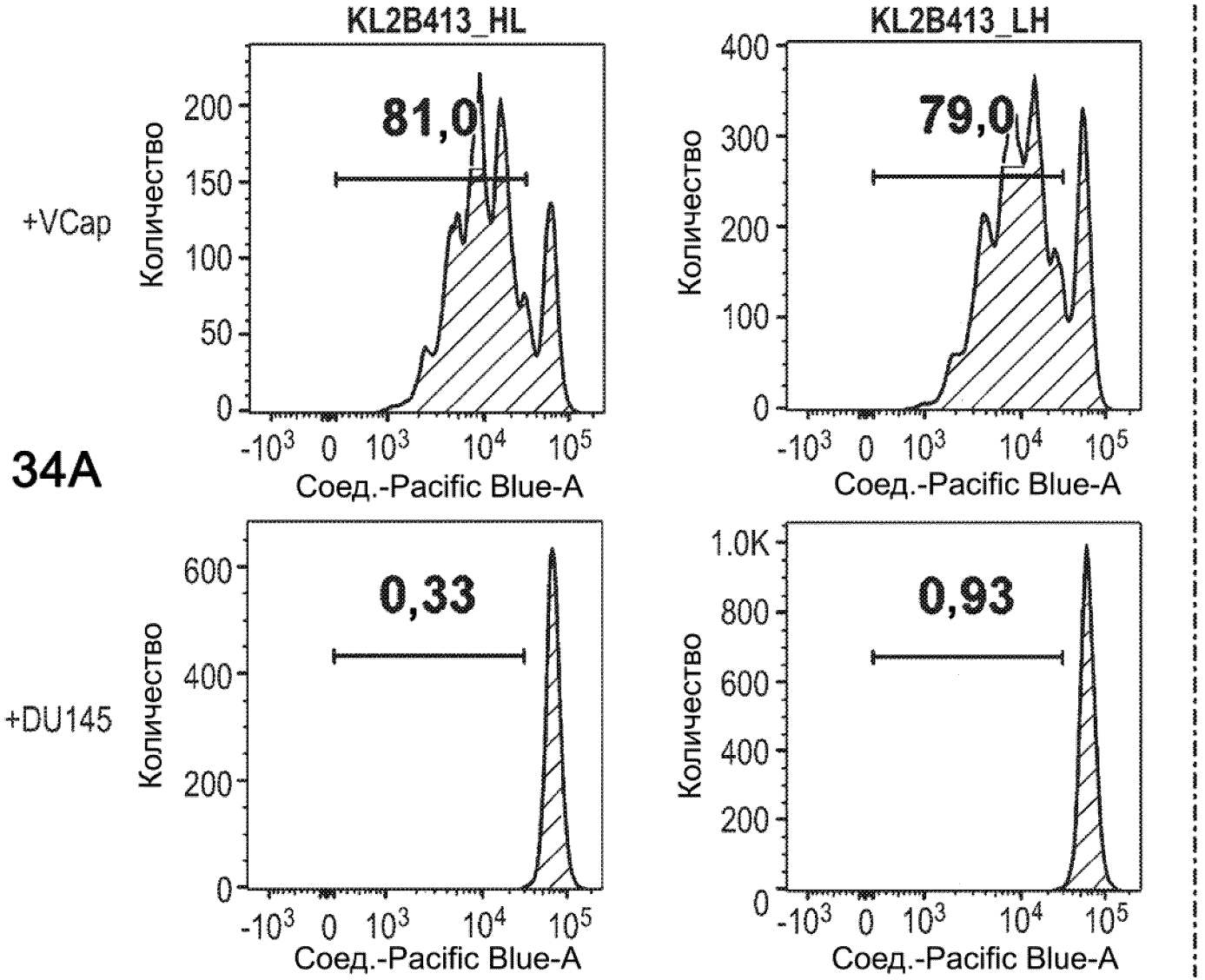
Фиг. 33B


Только Т-клетки
PMA+ иономицин
CD107a
hK2
Соед.-Pacific Blue-A
Соед.-PE-A
0,092
0,33
46,7
52,9
0,10
0,26
50,2
49,4
0,19
0,78
59,7
39,4
62,0
29,7
5,22
3,01
61,5
29,4
5,98
3,17
56,6
39,1
2,38
1,93

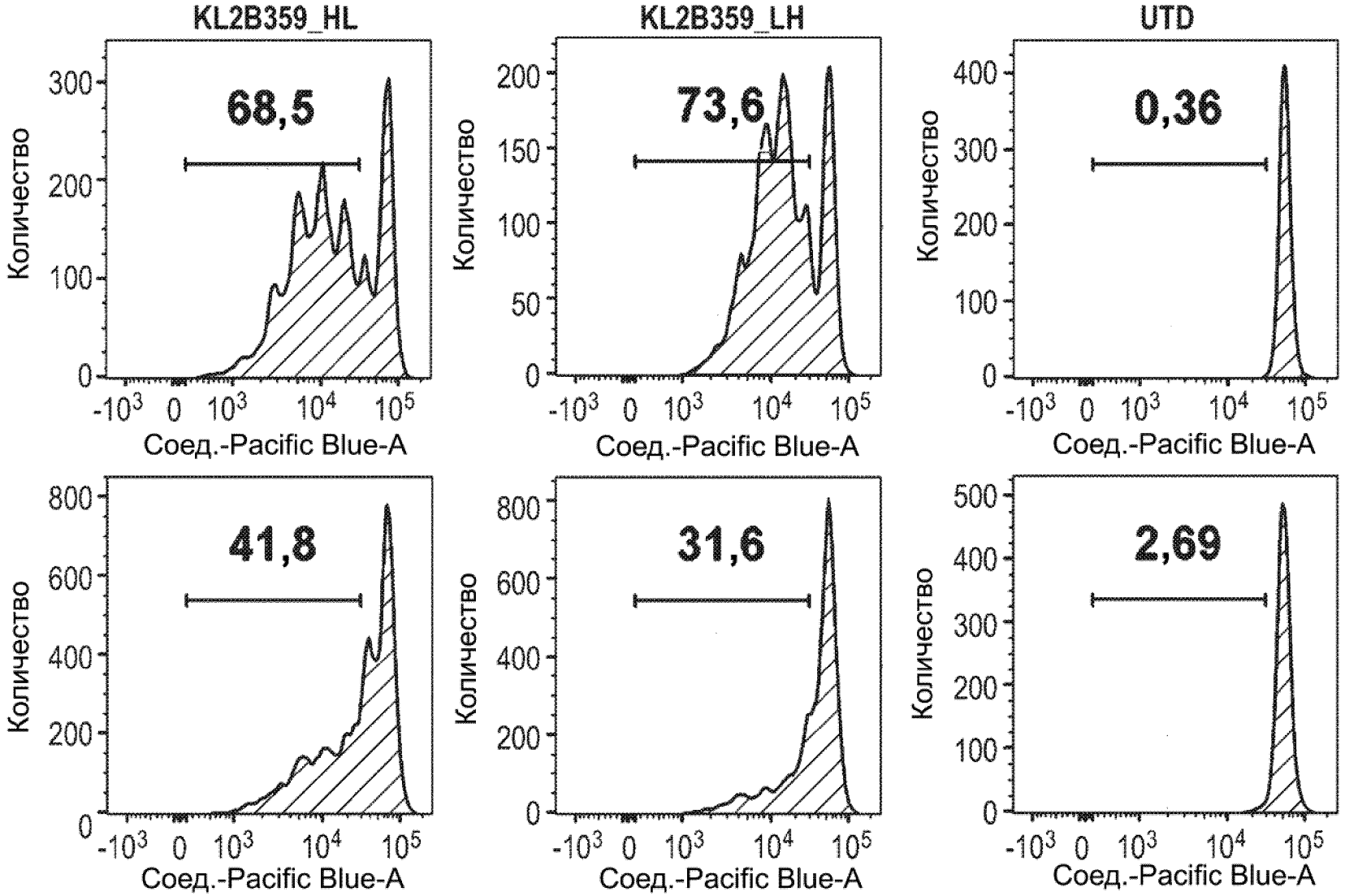


Фиг. 33B (продолж.)

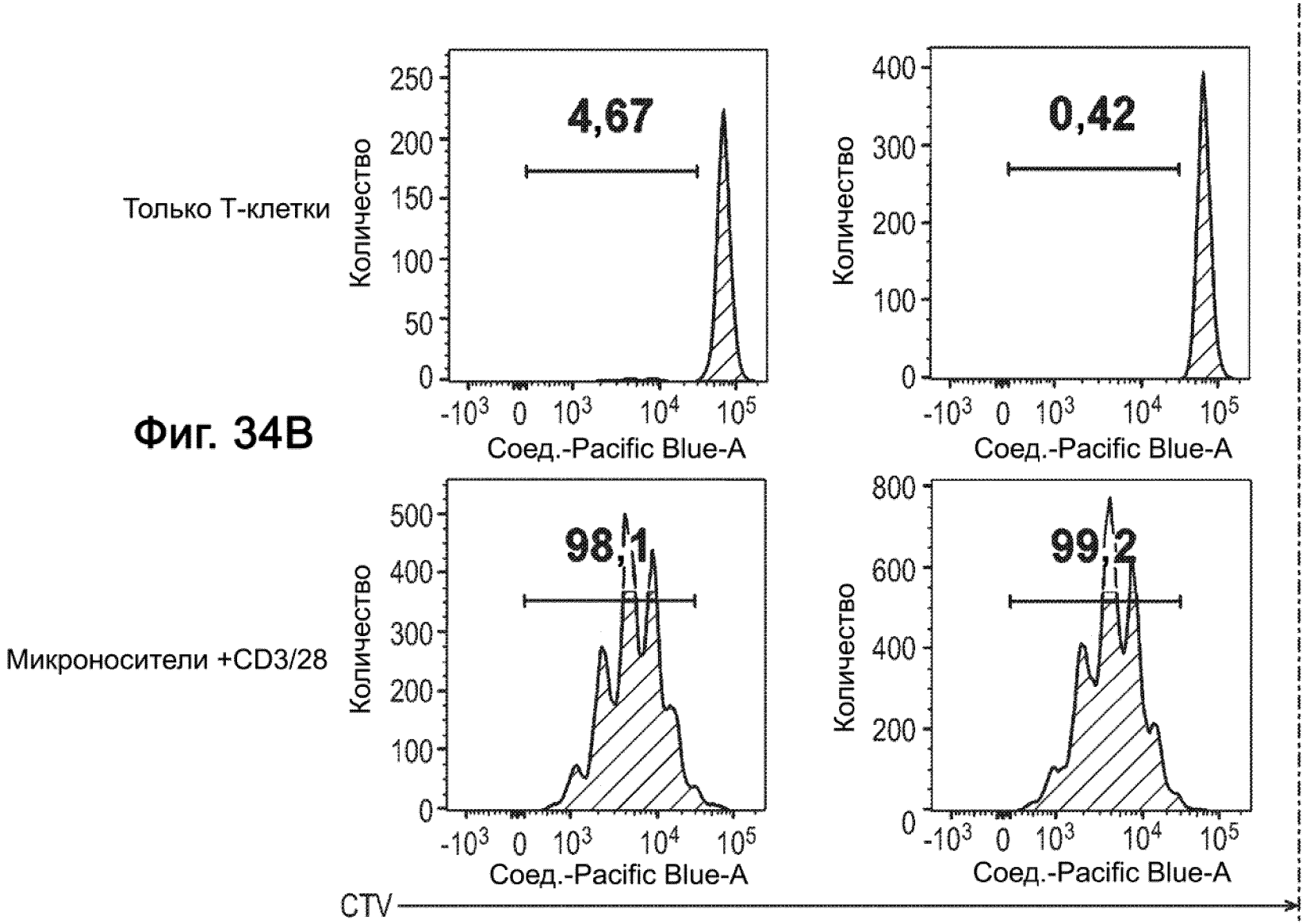
Фиг. 34A


KL2B413_HL
KL2B413_LH
+VCap
+DU145
81,0
79,0
0,33
0,93
Количество
Соед.-Pacific Blue-A
0
50
100
150
200
300
400
600
800
1.0K
-10^3
10^3
10^4
10^5

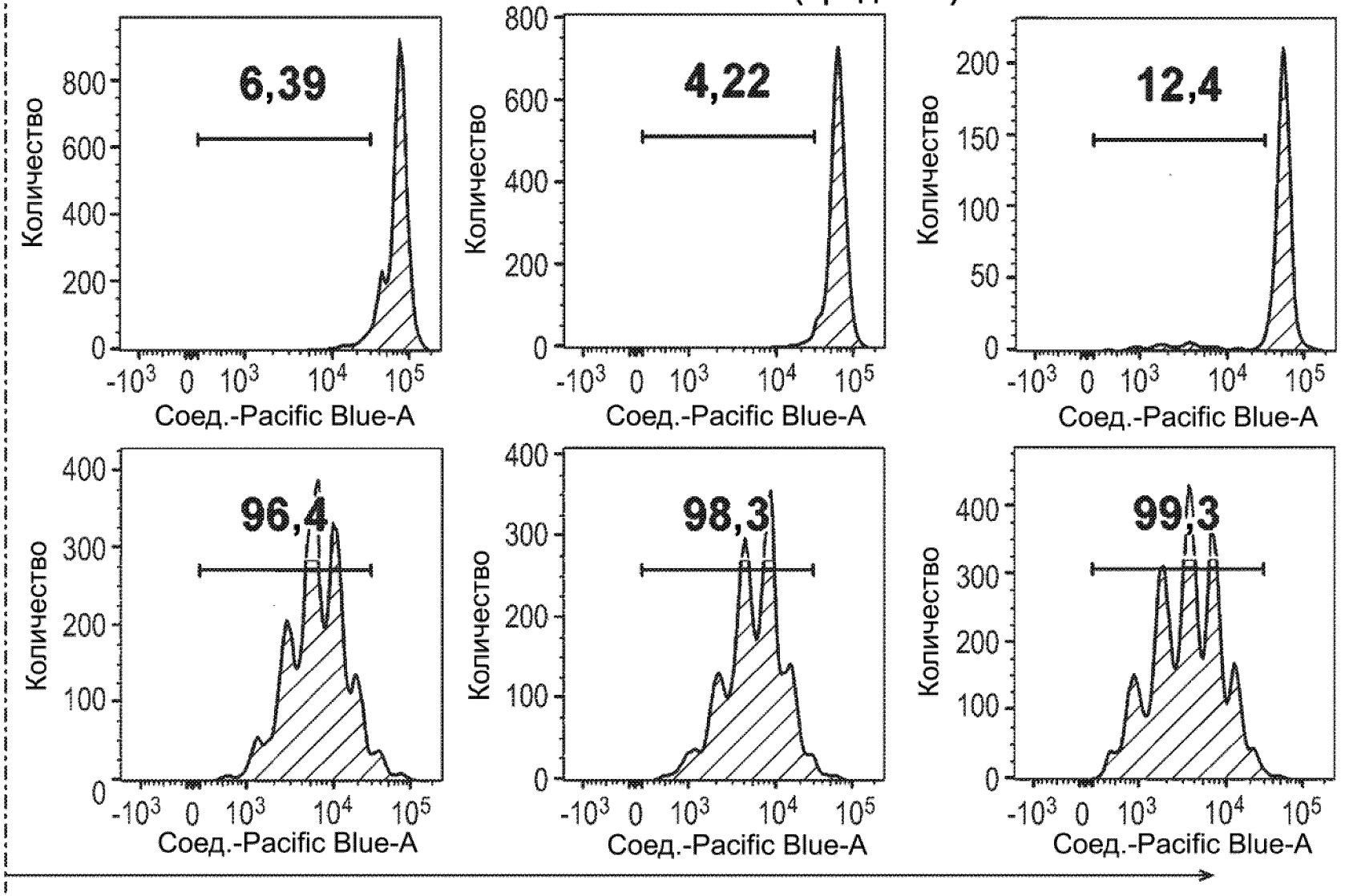
Фиг. 34A (продолж.)



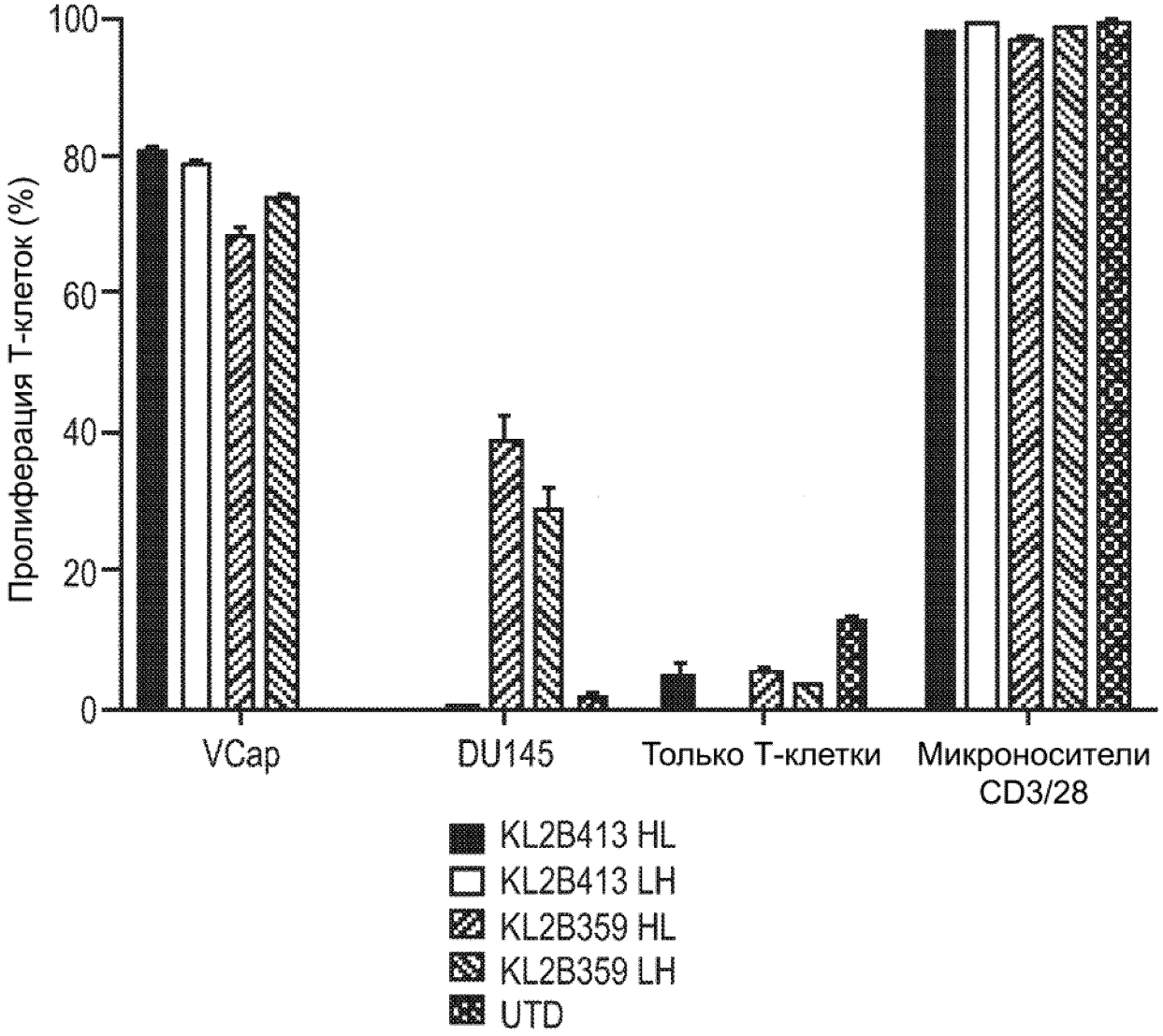
Фиг. 34B


Только Т-клетки
Микроносители +CD3/28
Количество
Соед.-Pacific Blue-A
4,67
0,42
98,1
99,2
CTV

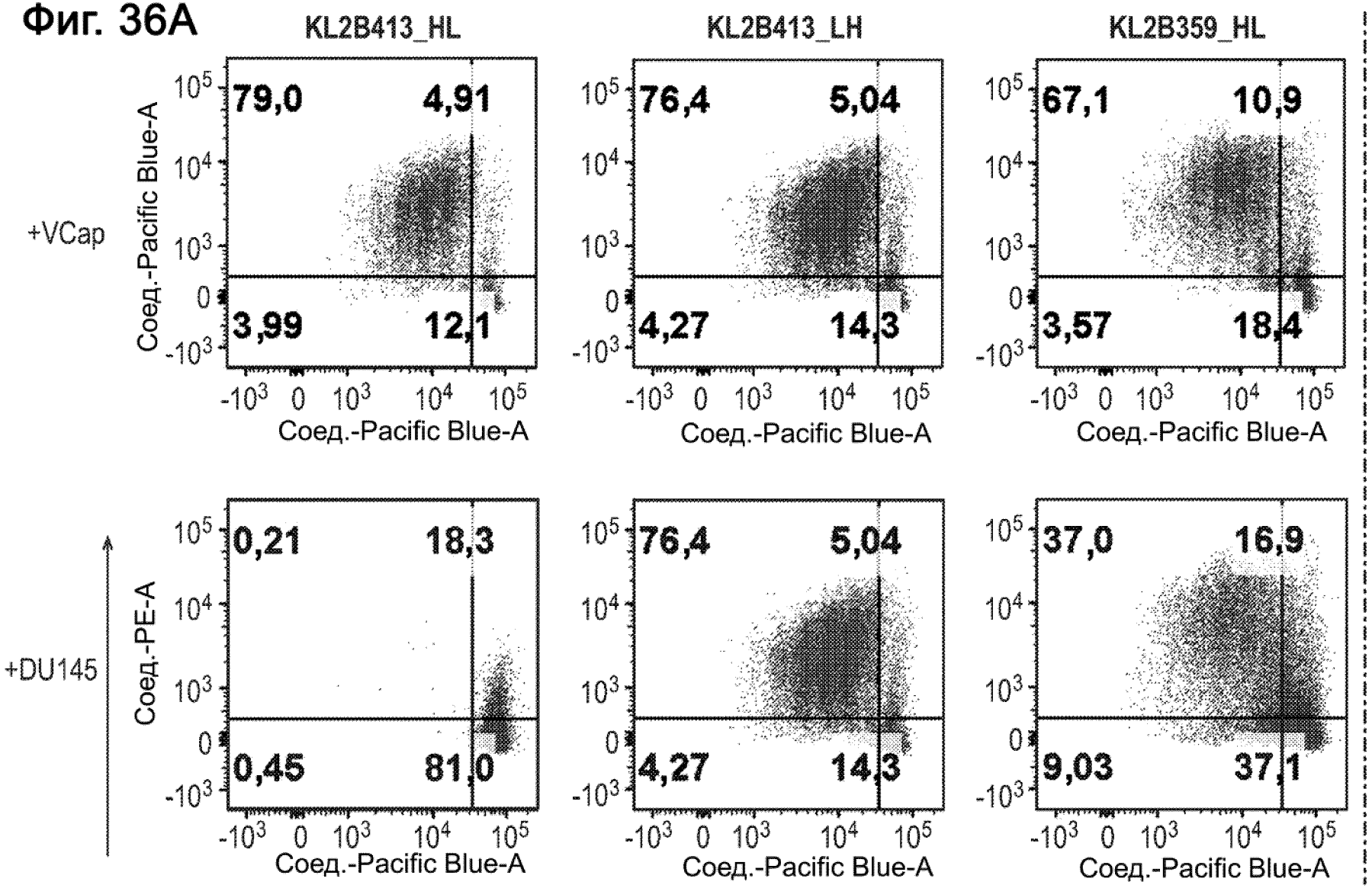
Фиг. 34B (продолж.)

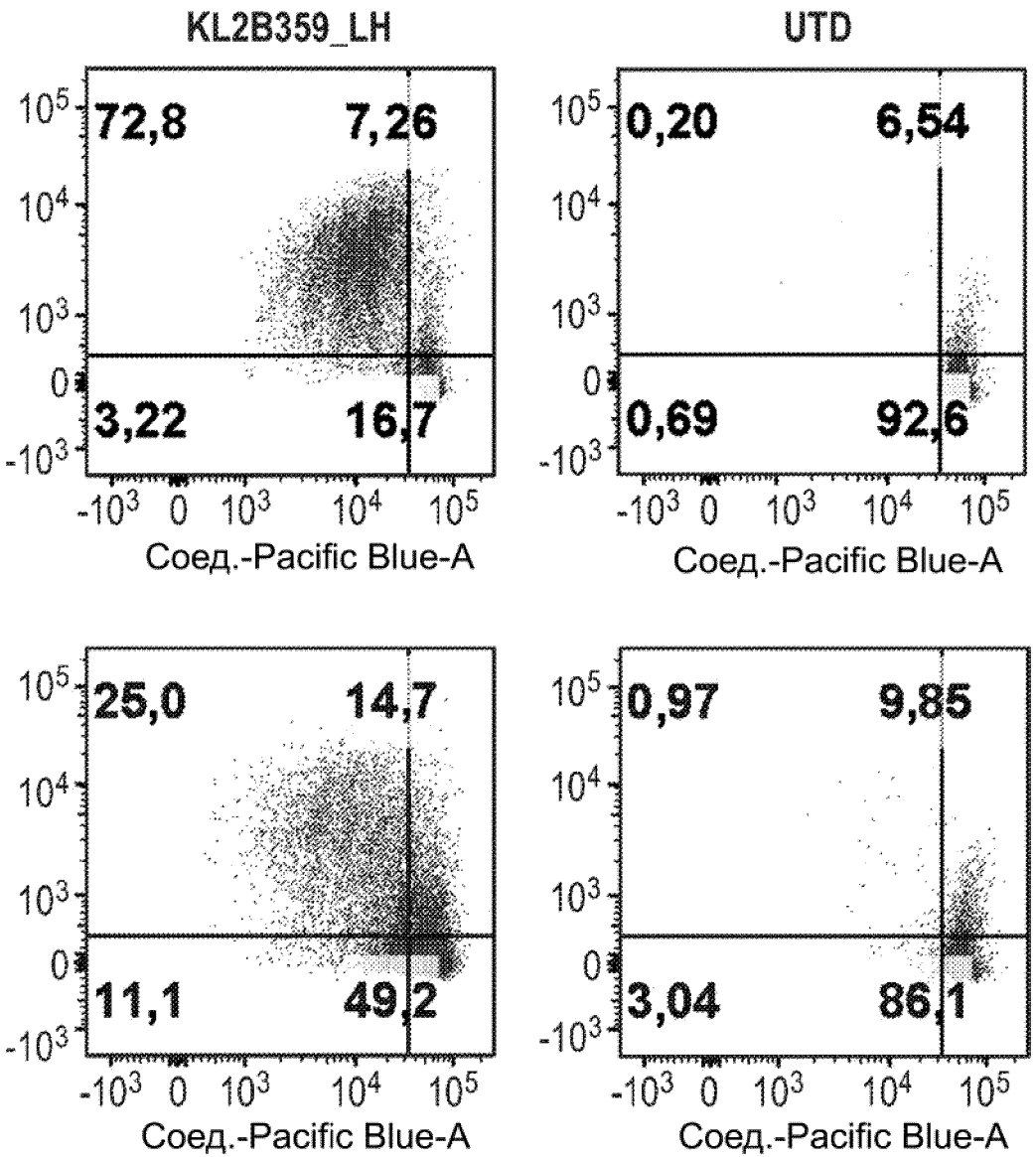


Фиг. 35


Пролиферация Т-клеток (%)
100
80
60
40
20
0
VCap
DU145
Только Т-клетки
Микроносители CD3/28
KL2B413 HL
KL2B413 LH
KL2B359 HL
KL2B359 LH
UTD

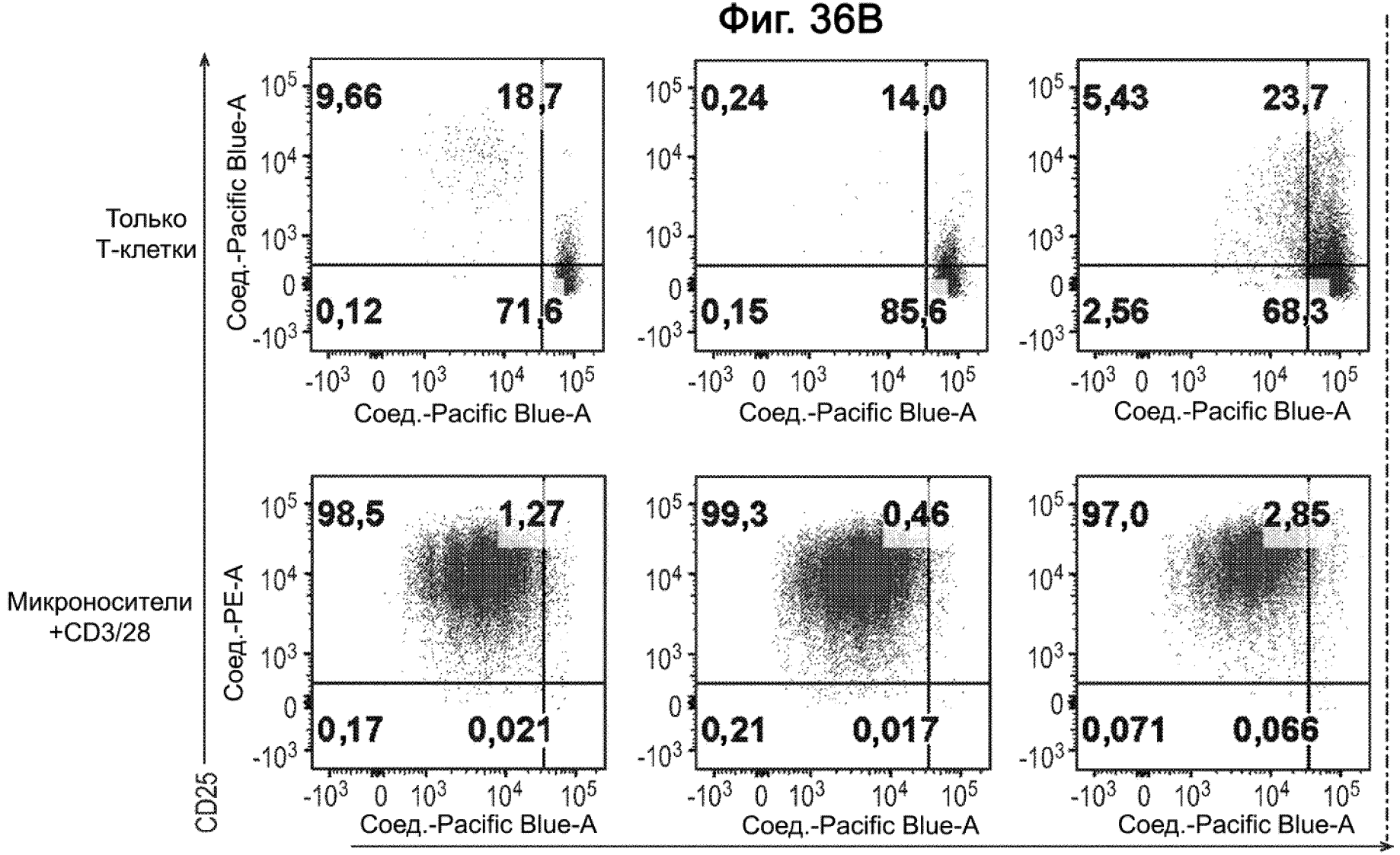
Фиг. 36A


KL2B413_HL
KL2B413_LH
KL2B359_HL
+VCap
+DU145
Соед.-Pacific Blue-A
Соед.-PE-A
79,0
4,91
3,99
12,1
76,4
5,04
4,27
14,3
67,1
10,9
3,57
18,4
0,21
18,3
0,45
81,0
76,4
5,04
4,27
14,3
37,0
16,9
9,03
37,1

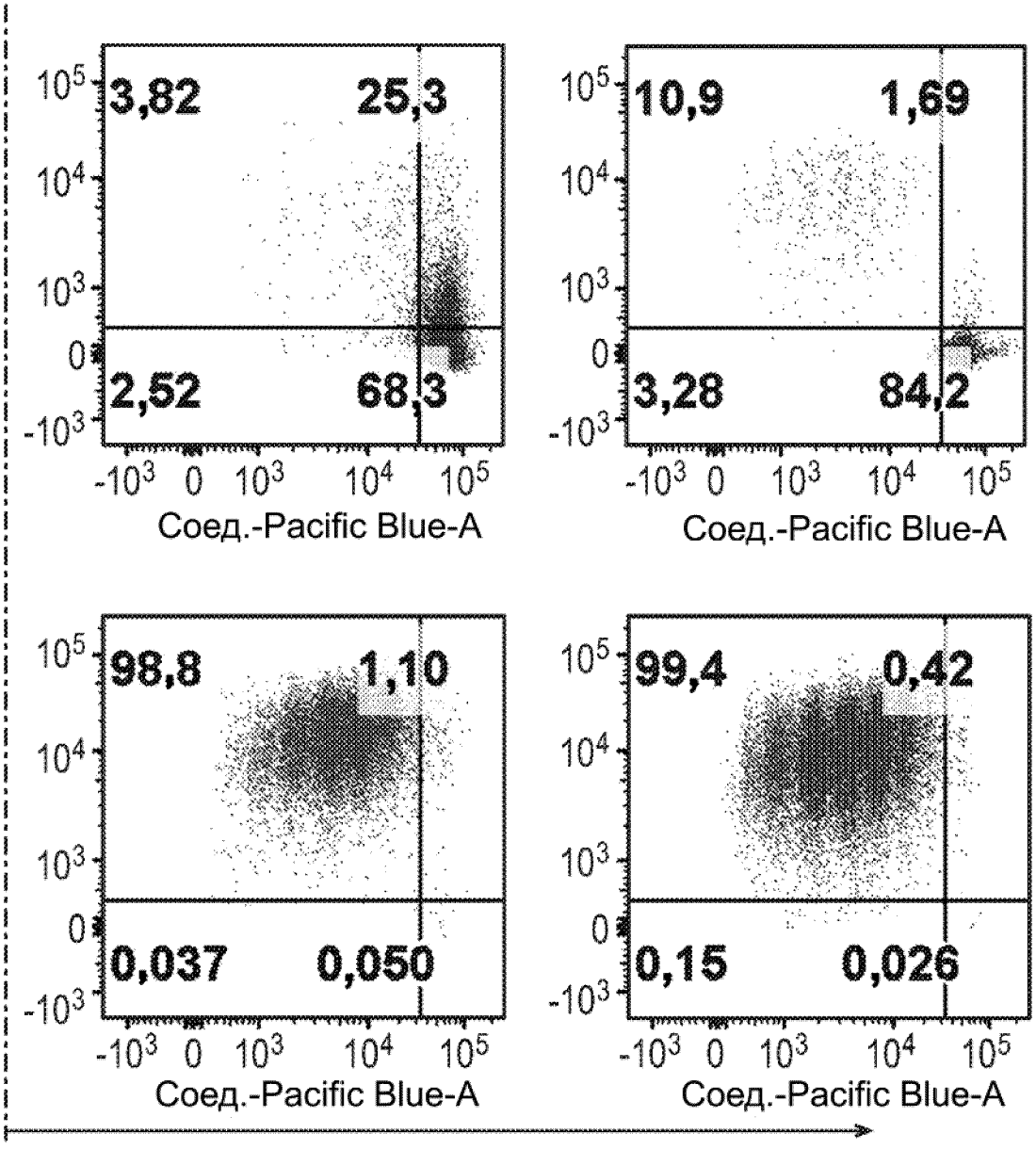


Фиг. 36A (продолж.)

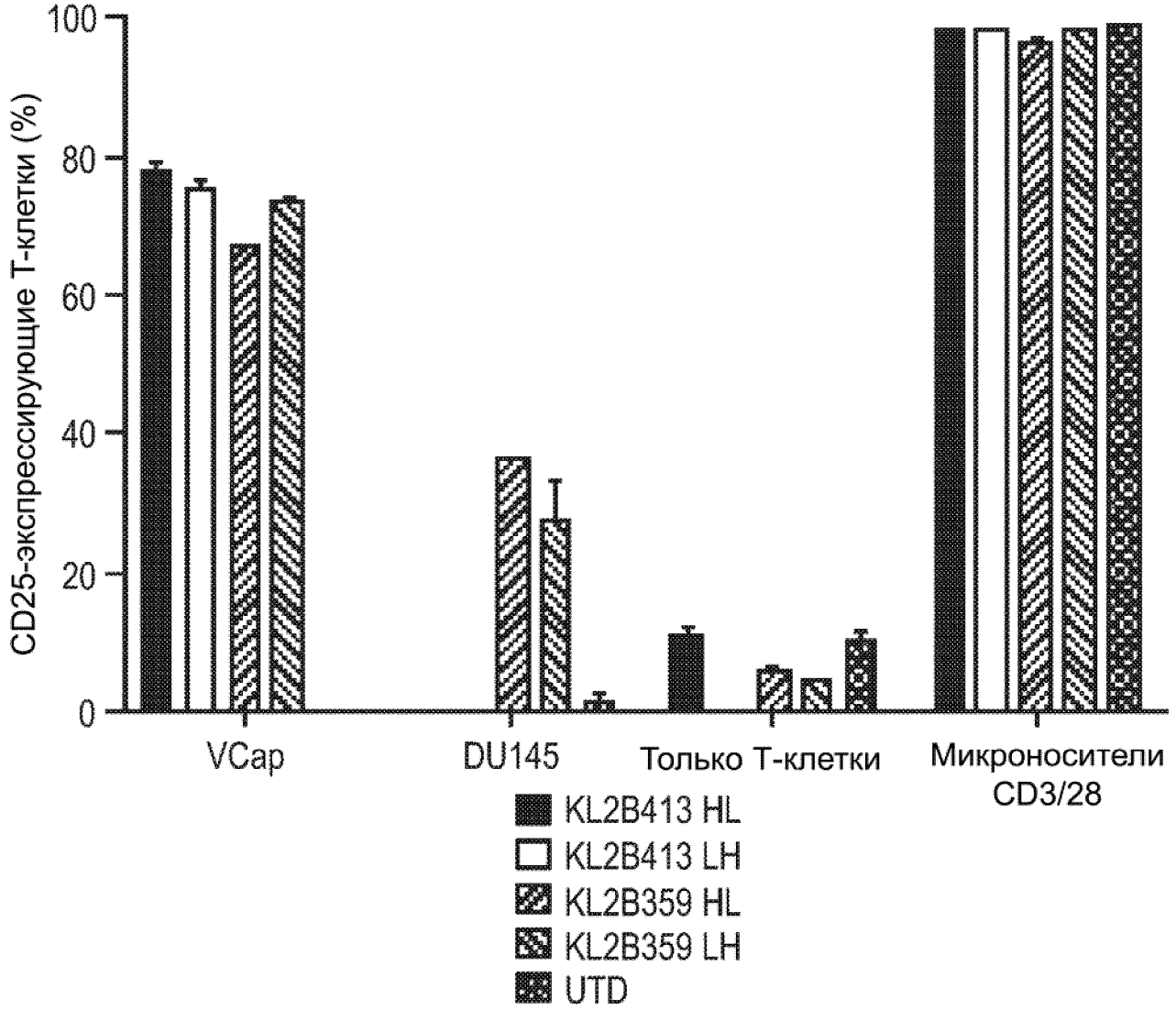
Фиг. 36B


Только
Т-клетки
Микроносители
+CD3/28
CD25
Соед.-Pacific Blue-A
Соед.-PE-A
9,66
18,7
0,12
71,6
0,24
14,0
0,15
85,6
5,43
23,7
2,56
68,3
98,5
1,27
0,17
0,021
99,3
0,46
0,21
0,017
97,0
2,85
0,071
0,066

Фиг. 36B (продолж.)



Фиг. 37


CD25-экспрессирующие Т-клетки (%)
100
80
60
40
20
0
VCap
DU145
Только Т-клетки
Микроносители CD3/28
KL2B413 HL
KL2B413 LH
KL2B359 HL
KL2B359 LH
UTD

Фиг. 38A

Последовательность KL2B494 (тяжелая цепь)

QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS HYAMSWVRQA PGKGLEWVST
IGGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKPH
IVMVTALLYD GMDVWGQGTM VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL
GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS
LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK THTCPPCPAP EAAGGPSVFL
FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVSVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
PREPQVYTLP PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK
TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS
LSPGK

Последовательность KL2B494 (легкая цепь)

SSELTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVVYDD
SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHVVFG
GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW
KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE
GSTVEKTVAP TECS

Фиг. 38B

Последовательность KL2B467 (тяжелая цепь)

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS YYGMHWVRQA PGKGLEWVAF
ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAHLP
YSGSYWAFDY WGQGTQVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAAG GPSVFLFPPK
PKDTLMISRT PEVTCVVVSV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP
VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
K

Последовательность KL2B467 (легкая цепь)

QSVLTQPPSV SVAPGQTASI TCGGDNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVVYDN
SDRPSGIPER FSGSNSGTTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHPVVF
GGGTKVTVLG QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA
WKADSSPVKA GVETTTPSKQ SNNKYAASSY LSLTPEQWKS HRSYSCQVTH
EGSTVEKTVA PTECS

Фиг. 38C

Последовательность hu11B6 (тяжелая цепь)

QVQLQESGPG LVKPSDTLSL TCAVSGNSIT SDYAWNWIRQ PPGKGLEWIG
YISYSGSTTY NPSLKSRVTM SRDTSKNQFS LKLSSVTAVD TAVYYCATGY
YYGSGFWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF
PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC
NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT
LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

Последовательность hu11B6 (легкая цепь)

DIVLTQSPDS LAVSLGERAT INCKASESVE YFGTSLMHWY QQKPGQPPKL
LIYAASNRES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQTRKVPY
TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

Фиг. 38D

Последовательность KL2B413 (тяжелая цепь)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMTWVRQP PGKGLEWVAN
IKQDGSERYF VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDQ
NYDILTGHYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL
GTKTYTCNVD HKPSNTKVDK RVESKYGPPC PPCPAPEAAG GPSVFLFPPK
PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SQEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP
VLDSDGSFFL YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSLG
K

Последовательность KL2B413 (легкая цепь)

EIVLTQSPSF LSASVGDRVT ITCRASQGIS SYLSWYQQKP GKAPKLLIYA
TSTLQSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP EDFATYYCQQ LNSYPRTFGQ
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

Фиг. 38E

Последовательность KL2B30 Fab биспецифического соединения KLCB80 (тяжелая цепь)

QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY
IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCAGTWI
EGVVTPNFYY GMDVWGQGTT VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL
GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS
LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK THTCPPCPAP EAAGGPSVFL
FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVSVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
PREPQVYVLP PSREEMTKNQ VSLLCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYL
TWPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS
LSPG

Последовательность KL2B30 Fab биспецифического соединения KLCB80 (легкая цепь)

DIQMTQSPSF LSASVGDRVT ITCRASQGIS SYLAWYQQKP GKAPKFLIYA
ASTLQSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP EDFATYYCQQ LNSYPLTFGG
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

Фиг. 38F

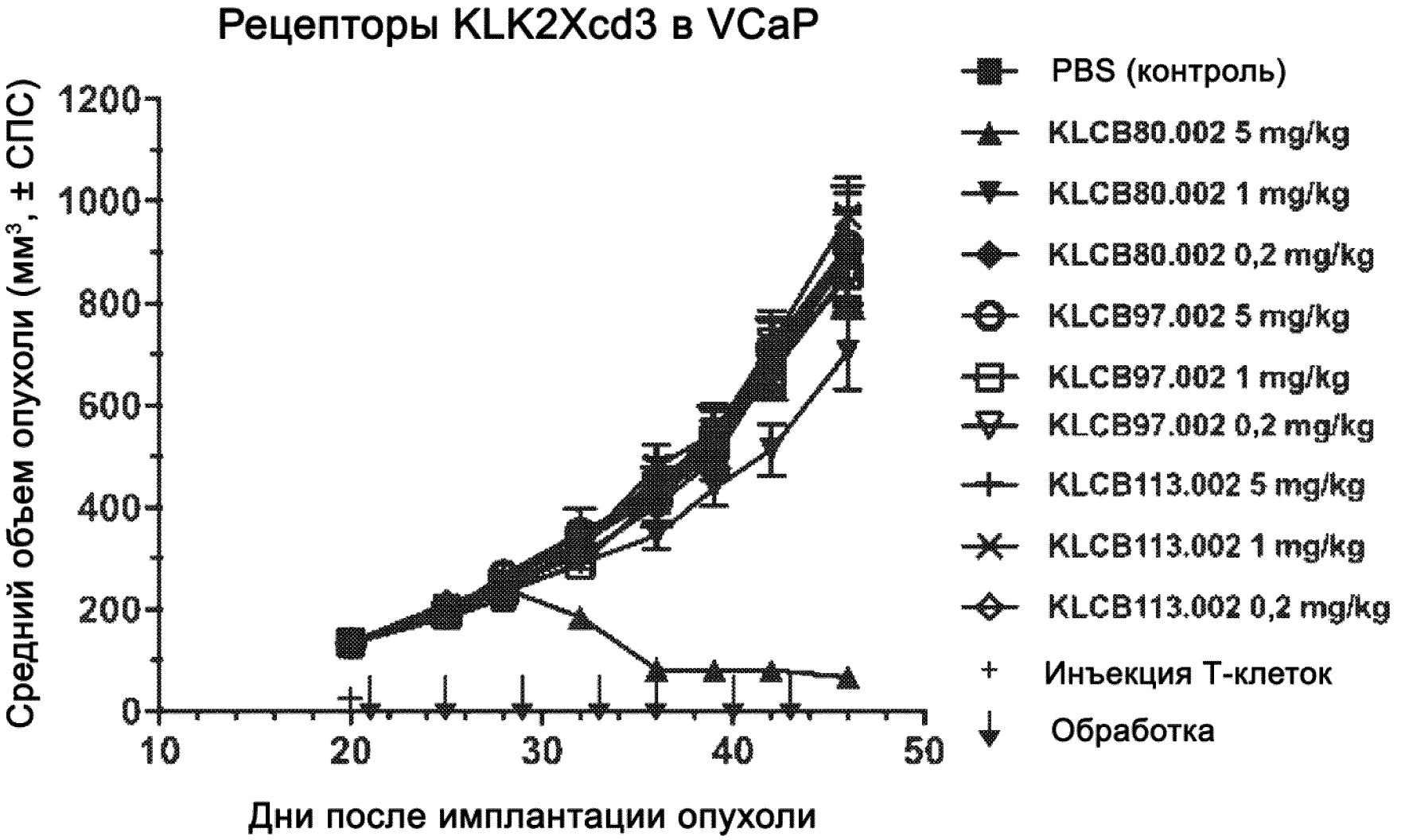
Последовательность KL2B353 Fab из биспецифического соединения KLCB113 (Тяжелая цепь)

EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCVASGFTFS SYDIHWVRQA PGKGLEWVAI
ISYDGSKKDY TDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMDSLRVED SAVYSCAREG
GMSHVYYYGM DVWGQGTMVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV SVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYVLPPS REEMTKNQVS LLCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYLTW
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PG

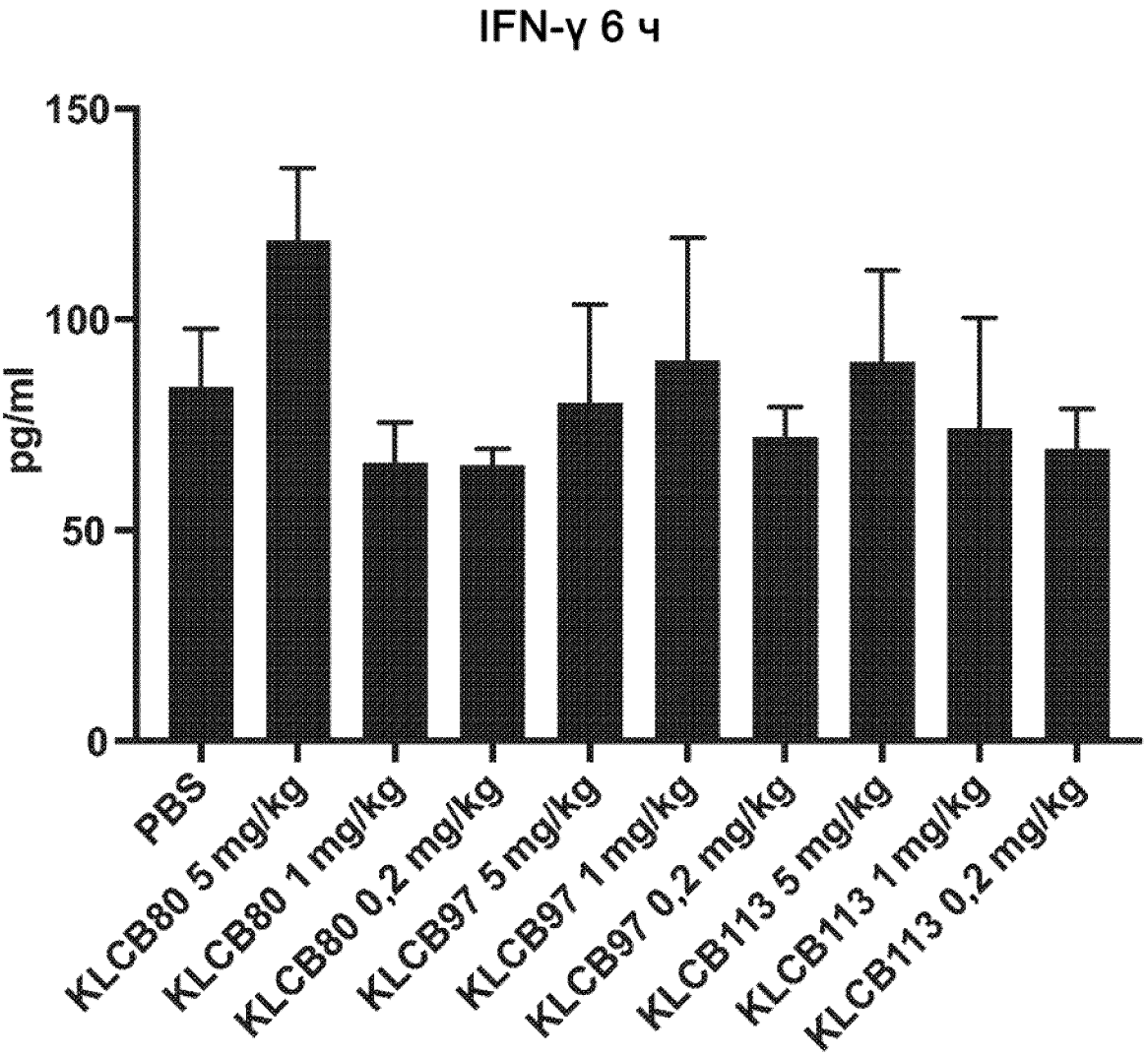
Последовательность KL2B353 Fab-биспецифического соединения KLCB113 (легкая цепь)

DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLAWYQQKP GKVPKFLIYA
ASTLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCQK YNSAPYTFGQ
GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

Фиг. 39A


Рецепторы KLK2Xcd3 в VCaP
Средний объем опухоли (мм³, ± СПС)
1200
1000
800
600
400
200
0
10
20
30
40
50
Дни после имплантации опухоли
PBS (контроль)
KLCB80.002 5 mg/kg
KLCB80.002 1 mg/kg
KLCB80.002 0,2 mg/kg
KLCB97.002 5 mg/kg
KLCB97.002 1 mg/kg
KLCB97.002 0,2 mg/kg
KLCB113.002 5 mg/kg
KLCB113.002 1 mg/kg
KLCB113.002 0,2 mg/kg
Инъекция Т-клеток
Обработка

Фиг. 39B


IFN-γ 6 ч
pg/ml
150
100
50
0
PBS
KLCB80 5 mg/kg
KLCB80 1 mg/kg
KLCB80 0,2 mg/kg
KLCB97 5 mg/kg
KLCB97 1 mg/kg
KLCB97 0,2 mg/kg
KLCB113 5 mg/kg
KLCB113 1 mg/kg
KLCB113 0,2 mg/kg

Фиг. 39B (продолж.)

